

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INTERACTIONS HÔTE/PARASITE PENDANT LES INFECTIONS PAR  
*PLASMODIUM*: ACTIVATION DES CELLULES T RÉGULATRICES  
NATURELLES ET MODULATION DES FONCTIONS EFFECTRICES DES  
MACROPHAGES

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR  
MATHIEU CAMBOS

JUILLET 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord exprimer ma gratitude à ma directrice de recherche, la Pr. Tatiana Scorza (Université du Québec à Montréal, UQAM), pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat au sein de son laboratoire. Je tiens aussi à la remercier pour son soutien, la pertinence de ses conseils et son aide inconditionnelle au cours de ces années.

J'aimerais aussi remercier mon co-directeur de recherche, le Pr. Armando Jardim (Université McGill), dont les conseils et les critiques ont permis d'améliorer la qualité de ma recherche et la pertinence des publications liées à mes travaux.

La réalisation de ce projet a été rendue possible par notre collaboration avec le Pr. Martin Olivier (Université McGill) qui nous a généreusement fourni de l'hémozoïne synthétique et la lignée de macrophages J774A.1 et avec le Pr. Ciriaco Piccirillo (Université McGill) qui nous a transmis l'hybridome PC11.

Je souhaiterais aussi remercier les Pr. Lucie Lamontagne, Paul Del Giorgio, Robert Moreau, François Dragon et Benoit Barbeau ainsi que le personnel d'enseignement dont M<sup>me</sup> Hélène Baumier, M<sup>me</sup> Marie-Josée Carbonneau et M<sup>r</sup> Luc Dubé pour leur contribution à la réalisation de certaines de mes expérimentations et à la correction de certains de mes manuscrits (UQAM).

Je souhaiterais remercier Christian Bleau, Jaime Sanchez, Marina Tiemi Shio, Denis Flipo, Marie Claude St-Louis, Caroline Martel, Élie Abed, Vincent Lemay, Alexandre Jacques pour leur aide et les discussions enrichissantes que nous avons eues.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire, Stéfany, Diane, Benoit, Jorge et Jaime (UQAM) pour les bons moments passés en leur compagnie. Leur bonne humeur et leur présence a rendu certains moments difficiles presque agréables. Plus particulièrement, j'aimerais souligner la contribution de M<sup>lle</sup> Stéfany Bazinet à la publication de mon second article.

Je tiens aussi à souligner l'importance du système de bourses aux étudiants de l'UQAM. Dans ce contexte, je souhaiterais remercier le département des sciences biologiques de l'UQAM qui m'a octroyé plusieurs bourses d'étude ayant grandement facilité ma vie lors de ces 5 années de doctorat. Je tiens aussi à remercier le centre de recherche sur les interactions hôte/parasite pour son soutien financier (Université McGill).

Merci aussi à ma famille et plus particulièrement à mes parents qui m'ont soutenu moralement et financièrement de manière inconditionnelle tout au long de mon cursus universitaire. Leur soutien a été grandement apprécié et essentiel à la réussite de mes projets.

Finalement, j'aimerais remercier ma conjointe Aurélie Girard pour sa patience, sa compréhension, son aide indéfectible ainsi que les nombreux sacrifices consentis durant la réalisation de mon doctorat.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>xviii</b>
 <b>INTRODUCTION.....</b>	 <b>1</b>
 <b>CHAPITRE I</b>	
<b>REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>5</b>
 <b>1.1 Malaria.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Épidémiologie.....	5
1.1.2 Cycle de vie du parasite .....	6
1.1.3 Modèles d'étude expérimentaux : avantages et faiblesses.....	11
1.1.4 Contrôle de la malaria.....	16
1.1.5 Protection et réponse immunitaire contre le <i>Plasmodium</i> .....	16
1.1.6 Pathologies associées à la malaria .....	24
1.1.7 État d'immunosuppression associé à la malaria .....	29
<b>1.2 Impact des cellules T régulatrices pendant les infections par <i>Plasmodium</i> .....</b>	<b>34</b>
1.2.1 Les cellules T régulatrices naturelles.....	36
1.2.2 Rôle des cellules T régulatrices naturelles <i>in vivo</i> .....	46
<b>1.3 Impact de l'HE et de l'HZ sur la production d'interleukine-12 des macrophages... 52</b>	
1.3.1 L'interleukine 12.....	52
1.3.2 Impact de l'HE et de l'HZ sur la sécrétion d'IL-12 des MP.....	62
<b>1.4 Impact de l'érythrophagocytose sur la viabilité des macrophages.....</b>	<b>72</b>
1.4.1 Le système réticulo-endothélial .....	72
1.4.2 Élimination des globules rouges sénescents par la rate .....	73
1.4.3 Impact de l'érythrophagocytose sur les fonctions effectrices des macrophages.....	81
1.4.4 Maladies associées à une proportion anormalement élevée de GR sénescents .....	82
1.4.5 Dysfonctions et apoptose des macrophages pendant la malaria .....	84

## CHAPITRE II

### NATURAL REGULATORY T CELLS (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) CONTROL THE PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES DURING *PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI* INFECTION AND DO NOT CONTRIBUTE TO IMMUNE EVASION ..... 86

<b>2.1 ABSTRACT.....</b>	<b>87</b>
<b>2.2 INTRODUCTION.....</b>	<b>88</b>
<b>2.3 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>90</b>
2.3.1 Parasites, mice and infections.....	90
2.3.2 Cell purification .....	90
2.3.3 Assessment of CD4 <sup>+</sup> T cell function .....	90
2.3.4 Phenotypic characterization of TregN cells by flow cytometry .....	91
2.3.5 <i>In vivo</i> depletion of CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cells.....	91
2.3.6 Quantification of IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ .....	92
2.3.7 Determination of haemoglobin in blood .....	92
2.3.8 Statistical analysis.....	93
<b>2.4 RESULTS .....</b>	<b>94</b>
2.4.1 Pro-inflammatory cytokines responses are enhanced during lethal <i>Pca</i> infection....	94
2.4.2 Parasite-specific Th1 effector cells are activated during lethal and non-lethal infection, but fail to produce IL-2 in response to anti-CD3 stimulation.....	95
2.4.3 The absolute numbers of activated TregN cells significantly increase during lethal infection but their depletion does not abrogate the lethality associated with DS parasites.....	95
2.4.4 Pro-inflammatory responses are further enhanced in absence of TregN cells.....	97
2.4.5 Severe anaemia is generated during lethal infection and is enhanced in absence of TregN cells.....	98
<b>2.5 DISCUSSION .....</b>	<b>108</b>
<b>2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>112</b>

### CHAPITRE III

<b>THE IL-12P70/IL-10 INTERPLAY IS DIFFERENTIALLY REGULATED BY FREE HEME AND HEMOZOIN IN MURINE BONE-MARROW-DERIVED MACROPHAGES.....</b>	<b>113</b>
<b>3.1 ABSTRACT.....</b>	<b>114</b>
<b>3.2 INTRODUCTION.....</b>	<b>115</b>
<b>3.3 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>117</b>
3.3.1 Chemicals.....	117
3.3.2 Preparation of synthetic HZ .....	117
3.3.3 Preparation of BMDM .....	117
3.3.4 Reactive oxygen species measurement .....	118
3.3.5 Determination of intracellular glutathione/glutathione disulphide ratios .....	118
3.3.6 SDS–PAGE and Western blot analysis of HO-1, p38 MAPK and MAPKAPK-2 ..	119
3.3.7 Induction of IL-12p40, IL-12p70 and IL-10.....	120
3.3.8 Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	120
3.3.9 Statistical analyses .....	121
<b>3.4 RESULTS .....</b>	<b>122</b>
3.4.1 HE impairs IL-12p70 responses in BMDM through downregulation of IL-12p35 and IL-12p40 gene expression.....	122
3.4.2 HE inhibits IL-12p70 responses through an IL-10-dependent mechanism .....	123
3.4.3 Prolonged exposure to HE induces ROS and decreases GSH/GSSG ratios on BMDM.....	124
3.4.4 NAC reverts the inhibitory effect of HE on IL-12p70 responses .....	125
3.4.5 Inhibition of p38 MAPK restores IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS in HE- conditioned BMDM.....	126
<b>3.5 DISCUSSION .....</b>	<b>138</b>

## CHAPITRE IV

### ROBUST ERYTHROPHAGOCYTOSIS LEADS TO MACROPHAGE APOPTOSIS VIA A HEMIN-MEDIATED REDOX IMBALANCE: ROLE IN HAEMOLYTIC

#### DISORDERS ..... 142

#### 4.1 ABSTRACT ..... 143

#### 4.2 INTRODUCTION ..... 144

#### 4.3 MATERIALS AND METHODS ..... 146

##### 4.3.1 Reagents ..... 146

##### 4.3.2 Mice, infections, and blood recovery ..... 146

##### 4.3.3 Oxidation of CRBC ..... 147

##### 4.3.4 Preparation of RBC ghosts ..... 147

##### 4.3.5 Culture and treatments of J774A.1 MP ..... 147

##### 4.3.6 FACS analysis ..... 148

##### 4.3.7 Annexin-V/PI staining ..... 148

##### 4.3.8 TUNEL assay ..... 149

##### 4.3.9 Hoechst 33258/PI staining ..... 149

##### 4.3.10 DNA fragmentation analysis on agarose gel ..... 149

##### 4.3.11 CFSE staining of RBC and quantification of erythrophagocytosis ..... 150

##### 4.3.12 H<sub>2</sub>-DCFDA staining of J774A.1 MP to quantify ROS production ..... 151

##### 4.3.13 Measurement of intracellular HE accumulation ..... 151

##### 4.3.14 Western blot analysis of HO-1 expression ..... 151

##### 4.3.15 Statistical analysis ..... 152

#### 4.4 RESULTS ..... 153

##### 4.4.1 Sustained phagocytosis of oxidized RBC and DSRBC decreases the viability of J774A.1 MP ..... 153

##### 4.4.2 Oxidized RBC and DSRBC induce the death of J774A.1 MP through apoptosis.. 154

##### 4.4.3 Induction of apoptosis requires cell-to-cell contact between RBC and J774A.1 MP ..... 154

##### 4.4.4 Ingestion of Hb following oxidized RBC and DSRBC phagocytosis is responsible for the induction of J774A.1 MP apoptosis ..... 155

##### 4.4.5 ROS are involved in Hb-dependent J774A.1 MP apoptosis induced by DSRBC and oxidized RBC ..... 156

4.4.6 Oxidized RBC-, DSRBC-, and HE-treated J774A.1 MP enter apoptosis despite induction of HO-1 .....	157
<b>4.5 DISCUSSION .....</b>	<b>172</b>
<b>4.6 AUTHORSHIP .....</b>	<b>177</b>
<b>4.7 ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>177</b>
 <b>CHAPITRE V</b>	
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>178</b>
 <b>5.1 Inhibition des cellules T lors de la phase érythrocytaire de la malaria.....</b>	<b>178</b>
5.1.1 Implication des cellules T régulatrices dans l'immunosuppression et la pathologie.....	178
5.1.2 Implication des MP dans l'inhibition des cellules T lors des infections par <i>Plasmodium</i> .....	186
<b>5.2 Modulation de la sécrétion d'IL-12 des macrophages lors de la malaria .....</b>	<b>189</b>
5.2.1 Effets associés à l'HZ .....	190
5.2.2 Effets associés à l'HE .....	192
<b>5.3 Érythrophagocytose et viabilité des macrophages .....</b>	<b>196</b>
5.3.1 Effet de l'HZ sur l'apoptose des MP pendant les infections par <i>Plasmodium</i> .....	196
5.3.2 Réflexion sur les mécanismes conduisant à l'apoptose des MP .....	197
<b>5.4 Réflexions générales.....</b>	<b>201</b>
5.4.1 Restauration de la sécrétion d'IL-12 et de la viabilité des MP lors des infections par <i>Plasmodium</i> .....	201
5.4.2 Immunosuppression pendant les infections par <i>Plasmodium</i> : bénéfique ou néfaste pour l'hôte? .....	203
 <b>CONCLUSION .....</b>	<b>205</b>
 <b>APPENDICE A</b>	
<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>211</b>
 <b>APPENDICE B</b>	
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>217</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>240</b>

## LISTE DES FIGURES

1.1	Pays affectés par la malaria en 2009.....	6
1.2	Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> .....	7
1.3	Cristaux d’HZ observés au microscope.....	8
1.4	Les deux modèles structuraux de l’HZ.....	9
1.5	Les principales populations de cellules Treg naturelles et inductibles.....	35
1.6	Schéma des différents rôles des cellules TregN.....	46
1.7	Quelques aspects de la régulation de la transcription du gène IL-12p40.....	55
1.8	Réactions de Haber-Weiss.....	65
1.9	Dégradation de l’hème par la hème oxygénase.....	66
1.10	Les effets toxiques de l’HE.....	69
1.11	Schématisation de l’architecture de la rate.....	75
1.12	Schématisation du passage des cellules sanguines du parenchyme vers le sinus veineux.....	76
1.13	Activation de la NADPH oxydase et production d’ions superoxydes.....	79
2.1	The production of pro-inflammatory cytokines is enhanced during lethal <i>Pca</i> infection.....	99
2.2	Parasite-specific TH1 effector cells are activated during infection but fail to produce IL-2 in response to anti-CD3 stimulation.....	100
2.3	The total numbers of activated Treg cells significantly increase during lethal DS strain infection.....	101
2.4	Treatment with the PC61 mAb significantly eliminates the total numbers of activated TregN cells in naïve and infected mice.....	102

2.5	Depletion of TregN cells exacerbates the parasite burden in mice with lethal DS strain infection.....	103
2.6	<i>In vivo</i> administration of the PC61 mAb decreases the total numbers of CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cells but does not affect the numbers of activated CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> lymphocytes during infection.....	104
2.7	Parasite specific IL-2 and IFN- $\gamma$ responses by CD4 <sup>+</sup> T cells are restored in absence of TregN cells.....	105
2.8	The production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ is enhanced in the absence of TregN cells.....	106
2.9	Anaemia is exacerbated in absence of TregN cells.....	107
3.1	HE has a major negative impact on IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS which is unrelated to down-regulation of IL-12p40 secretion.....	128
3.2	HE and HZ down regulate IL-12p35 and IL-12p40 gene expression in response to IFN- $\gamma$ /LPS stimulation.....	129
3.3	IL-10 secretion in HE-conditioned BMDM is refractory to the inhibitory effects of IFN- $\gamma$ .....	130
3.4	Neutralization of IL-10 restores IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM.....	131
3.5	ROS are generated after short-term and long-term exposure to HE.....	132
3.6	HE decreases intracellular GSH/GSSG ratios in BMDM.....	133
3.7	HO-1 protein levels significantly increase after 6h exposure to HE.....	134
3.8	NAC restores IL-12p70 responses and decreases IL-10 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM.....	135
3.9	SB203580 efficiently inhibits p38 MAPK activity in BMDM.....	136
3.10	Inhibition of p38 MAPK restores IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS only in HE-conditioned BMDM.....	137
4.1	Oxidized RBC and DSRBC are readily phagocytised by J774A.1 MP.....	159
4.2	Apoptosis of J774A.1 MP is induced by oxidized RBC and DSRBC <i>in vitro</i> ...	160
4.3	Oxidized RBC and DSRBC induce apoptosis in J774A.1 MP cells.....	162

4.4	Cell-to-cell contact is required for induction of J774A.1 apoptosis by oxidized RBC and DSRBC.....	164
4.5	Ingestion of Hb by phagocytes is responsible for J774A.1 MP apoptosis.....	165
4.6	HE possesses pro-apoptotic abilities and accumulates within J774A.1 MP following oxidized RBC treatment.....	167
4.7	Oxidized RBC and DSRBC induce J774A.1 MP apoptosis through a HE-mediated redox imbalance.....	168
4.8	HO-1 activation as a protective mechanism following oxidized RBC, DSRBC, and HE <i>in vitro</i> treatment of J774 MP.....	170
5.1	Origine et contrôle du stress oxydatif au sein des MP suite à la phagocytose de GR.....	200
C1	Les cellules TregN activées lors des infections par <i>Pca</i> permettent de contrôler l'inflammation et de limiter l'anémie.....	208
C2	Inhibition de la sécrétion d'IL-12 des MP par l'HE.....	209
C3	Induction de l'apoptose des MP suite à la phagocytose de GR lors des infections par <i>Plasmodium</i> .....	210



## LISTE DES TABLEAUX

1.1	Comparaison des caractéristiques des quatre espèces de <i>Plasmodium</i> employées dans les modèles expérimentaux murins et des <i>Plasmodium</i> infectant l'homme .....	12
1.2	Virulence des espèces de <i>Plasmodium</i> employées dans les modèles murins en fonction du patrimoine génétique de l'hôte.....	15
5.1	Récapitulation des études ayant évalué l'impact des cellules TregN lors des infections par <i>Plasmodium</i> chez la souris.....	183
5.2	Récapitulation des études ayant évalué l'impact des cellules TregN lors des infections par <i>Plasmodium</i> chez l'homme.....	185

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

5P8 buffer: « 5 mM sodium phosphate buffer (pH 8) »  
ADCC: « antibody-dependent cellular cytotoxicity »  
ADCI: « antibody-dependent cellular inhibition »  
ADN: acide désoxyribonucléique  
AIF: « apoptosis-inducing factors »  
AKT/PI3K: « phosphatidylinositol-3-kinase »  
AML-1/Runx1: « Runt-related transcription factor 1 »  
AMP: adénosine monophosphate  
ANOVA: « analysis of variance »  
AP-1: « activator protein 1 »  
APC: allophycocyanine  
APC: « antigen presenting cell »  
ARN: acide désoxyribonucléique  
ATPase: adénosine triphosphatase  
BHA: « butylated hydroxyanisole »  
BMDM: « bone marrow-derived macrophage »  
β-ME: β-mercaptoéthanol  
BSA: « bovine serum albumin »  
BSO: butyl-sufoimine  
CAD: « caspase-activated DNase »  
CCR5: « C-C chemokine receptor type 5 »  
CD: cellules dendritiques  
CDX: « cluster of differentiation X (ex: CD4, CD8 ...) »  
C/EBP β: « CCAAT / enhancer binding protein β »  
CFSE: « carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester »  
CLMF: « cytotoxic lymphocyte maturation factor »  
CM: « complete medium »  
CO: « carbon monoxide » / monoxyde de carbone  
CoPPIX: « cobalt protoporphyrin IX »  
CPA: cellules présentatrices d'antigène  
CpG-ODN: CpG oligodéoxynucléotides  
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
CR3: récepteur du complément 3  
CRBC: « control RBC »  
CREB: « c-AMP response element-binding »  
CS (protéine): « circumsporozoite protein »  
CTLA-4: « cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 »  
DEM: diéthylmaléate  
DEREG: « depletion of regulatory T cells »  
DK: *Plasmodium chabaudi adami* DK (souche non virulente)

DEM: diéthylmaléate  
 DERE: « depletion of regulatory T cells »  
 DK: *Plasmodium chabaudi adami* DK (souche non virulente)  
 DNA: « deoxyribonucleic acid »  
 DS: *Plasmodium chabaudi adami* DS (souche virulente)  
 DSRBC: « RBC from *Plasmodium chabaudi adami* DS-infected mice »  
 Ebi3: « Epstein Barr virus induced gene 3 »  
 EDTA: « ethylene diamine tetra acetic acid »  
 EKLF: « Erythroid Krüppel-like Factor »  
 ELISA: « enzyme-linked immunosorbent assay »  
 EPO: érythropoïétine  
 ERK-1/2: « extracellular signal-regulated kinases 1/2 »  
 ETS-2: « E-twenty six 2 »  
 FACS: « Fluorescence Activated Cell Sorting »  
 FBS: « fetal bovine serum »  
 FcR : récepteur Fc  
 FITC: « fluorescein isothiocyanate »  
 FL-1: fluorescence 1  
 FOXP3 (protéine)/*foxp3* (gène): « forkhead box P3 »  
 FSC: « forward scatter (light) »  
 GAPDH: « Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase »  
 GAS: « gamma-interferon activating site »  
 GTR: « glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor »  
 GM-CSF: « granulocyte macrophage colony-stimulating factor »  
 GPI: « glycosylphosphatidylinositol »  
 GR: globules rouges  
 GRDS: GR de souris infectées par le *PcaDS*  
 GR IgG: globules rouges opsonisés avec des IgG  
 GSH: glutathion réduit  
 GSK-3: « glycogen synthase kinase 3 »  
 GSSG: glutathion oxydé  
 H<sub>2</sub>-DCFDA: « 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate »  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène  
 HAT/HDAC: « histone acetyltransferase/histone deacetylases »  
 Hb: hémoglobine / « haemoglobin »  
 HDP: « heme detoxification protein »  
 HE: hémine  
 HEPES: « 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid »  
 HIV: « human immunodeficiency virus »  
 HO-1: hème oxygénase 1  
 Hp: haptoglobine  
 HRP: « histidine rich proteins »  
 HRP: « horseradish peroxidase »  
 Hx: hémopexine  
 HZ: pigment malarique aussi appelé hémozoïne  
 IBMC: « intervillous blood mononuclear cells »

ICAD: « inhibitor of CAD »  
 ICAM-I: « intra-cellular-adhesion molecule I »  
 ICBSP: « interferon consensus sequence-binding protein »  
 IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase  
 IFN- $\alpha$ : interféron alpha  
 IFN- $\beta$ : interféron beta  
 IFN- $\gamma$ : interféron gamma  
 IgG: immunoglobuline G  
 IL-X: interleukine X (ex. : IL-1, IL-2...)  
 IL-2R $\alpha$ : chaîne alpha du récepteur de l'IL-2  
 IL-2R $\beta$ : chaîne beta du récepteur de l'IL-2  
 IL-12R: récepteur de l'IL-12  
 IPEX: « immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome »  
 IRF: « interferon regulatory transcription factor »  
 ISRE: « interferon-stimulated response element »  
 LAG3: « lymphocyte-activation gene 3 »  
 LAK cellules: « lymphocyte-activated killer cells »  
 Lck: « lymphocyte-specific protein tyrosine kinase »  
 LCMV: « virus lymphocytaire choriomeningitis »  
 LDL: « low-density lipoprotein »  
 L-NMMA: « L-NG-monométhyle arginine »  
 LTC: lymphocytes T cytotoxiques  
 LFA-1: « lymphocyte function-associated antigen 1 »  
 LPS: lipopolysaccharide  
 mAb: « monoclonal antibody »  
 MAPK: « mitogen activated protein kinase »  
 MAPKAPK-2: « MAP kinase-activated protein kinase 2 »  
 MC: malaria cérébrale  
 MCP-1: « monocyte chemotactic protein 1 »  
 M-CSF: « macrophage colony-stimulating factor »  
 MetHb: méthémoglobine  
 MFI: « mean fluorescence intensity »  
 MHC: « major histocompatibility complex »  
 MIF: « macrophage migration inhibitory factor »  
 MKK3: « MAPK kinase 3 »  
 MP: macrophages  
 MSP-1: « merozoite surface protein 1 »  
 Myd88: « myeloid differentiation primary response gene 88 »  
 NAC: N-Acetyl Cystéine  
 NADPH oxydase: « nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase »  
 NK: « natural killer »  
 NLR: « NOD-like receptor »  
 NFAT: « nuclear factor of activated T-cells »  
 NF $\kappa$ B: « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »  
 NKSF: « natural killer cell stimulating factor »  
 NO: « nitric oxide » / oxyde nitrique

OH<sup>-</sup>: ion hydroxyde  
 OH: ion hydroxyle  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ion superoxyde  
 OMS: organisation mondiale de la santé  
 pAb: « polyclonal antibody »  
*Pb*: *Plasmodium berghei*  
*PbA*: *Plasmodium berghei* ANKA  
*PbNK65*: *Plasmodium berghei* NK65  
 PBMC: « peripheral blood mononuclear cells »  
*Pca*: *Plasmodium chabaudi adami*  
*PcaDS*: *Plasmodium chabaudi adami* DS  
*PcaDK*: *Plasmodium chabaudi adami* DK  
*Pcc*: *Plasmodium chabaudi chabaudi*  
*PccAS*: *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS  
 PD-1: « programmed death 1 »  
 PfEMPI: « *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 »  
 kDa: kilo dalton  
 PGE: prostaglandine E  
 PGE2: prostaglandine E2  
 PHA: phyto-hémagglutinine  
 PKC: protéine kinase C  
 PMA: phorbol myristate acétate  
 PMSF: « phenylmethanesulfonylfluoride »  
 PI: « propidium iodide »  
 RBC: « red blood cells »  
 PBS: « phosphate buffered saline »  
 PRBC: « parasitized red blood cells »  
*Py*: *Plasmodium yoelii*  
*PyL*: *Plasmodium yoelii* 17XL  
*PyNL*: *Plasmodium yoelii* 17XNL  
*PyYM*: *Plasmodium yoelii* YM  
 RAG: « recombinant-activating gene »  
 RES: « reticulo-endothelial system »  
 RLR: « RIG-like receptor »  
 RNA: « ribonucleic acid »  
 ROS: « reactive oxygen species »  
 RPMI (medium): « Roswell Park Memorial Institute (medium) »  
 RT-PCR: « reverse transcription polymerase chain reaction »  
 SD: « standard deviation »  
 SDS-PAGE: « sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis »  
 SEM: « standard error of the mean »  
 SIDA: syndrome de l'immunodéficience acquise  
 SIV: « simian immunodeficiency virus »  
 Smac/Diablo: « second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis protein-binding protein with low pI »  
 SSC: « side scatter (light) »

STAT-X: « signal transducer and activator of transcription (ex.: STAT-1, STAT-3...) »  
TBS (buffer): « Tris-buffered saline »  
TCR: « T cell receptor »  
TEAM: triéthanolamine  
TGF- $\beta$ : « transforming growth factor beta »  
Th0: « T helper 0 »  
Th1: « T helper 1 »  
Th2: « T helper 2 »  
Th3: « T helper 3 »  
TLR: « Toll-like receptor »  
TMB: « 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine »  
TNF- $\alpha$ : « tumor necrosis factor alpha »  
TNF- $\beta$ : « tumor necrosis factor beta »  
Tr1 cells: « T regulatory cells 1 »  
TRAIL: « tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand »  
Treg (cellules): cellules T régulatrices  
TregI (cellules): cellules T régulatrices inductibles  
TregN (cellules): cellules T régulatrices naturelles  
TUNEL: « Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling »  
ZnPPIX: « zinc protoporphyrin IX »

## RÉSUMÉ

La malaria, maladie causée par le protozoaire *Plasmodium*, tue chaque année plus d'un million de personnes. L'émergence de parasites résistants à plusieurs traitements anti-malariques ainsi que l'absence de vaccin efficace rendent la lutte contre le *Plasmodium* de plus en plus difficile. Afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'optimiser l'efficacité des vaccins dans les zones endémiques, une meilleure compréhension des interactions hôte/parasite est nécessaire. Lors de la malaria, un état d'immunosuppression systémique est induit par le parasite. Cet état de suppression immunitaire pourrait être à l'origine de la persistance du parasite au sein de l'hôte ainsi que de la difficulté à obtenir une protection efficace contre la réinfection décrite dans les zones endémiques. Mieux comprendre comment le *Plasmodium* interfère avec la réponse immunitaire permettra de mettre en place des thérapies favorisant la résolution des infections par ce parasite. Dans ce sens, notre étude a pour but d'évaluer l'activation des cellules T régulatrices naturelles (TregN) ainsi que la modulation de la physiologie des macrophages (MP) lors des infections par *Plasmodium*.

Une étude antérieure a suggéré que l'activation des cellules TregN lors des infections par *Plasmodium yoelii* 17XL (PyL) était impliquée dans le développement de l'immunosuppression et permettait au parasite d'échapper au système immunitaire. En utilisant un modèle alternatif d'infection par *Plasmodium*, nous avons démontré que l'activation des cellules TregN pouvait aussi représenter un mécanisme protecteur pour l'hôte. Lors des infections par *Plasmodium chabaudi adami* (Pca) chez les souris BALB/c, l'activation des cellules TregN permet de tempérer la réponse immunitaire afin d'éviter le développement d'une inflammation excessive sans toutefois affecter le contrôle du parasite. Ainsi, il semblerait que le rôle des cellules TregN lors des infections par *Plasmodium* dépende de l'espèce du parasite considérée.

Les infections par *Plasmodium* sont associées à une diminution de la sécrétion d'interleukine 12 (IL-12) et de la viabilité des MP ayant vraisemblablement des répercussions sur le développement de la pathologie et le contrôle du parasite. Notre étude a démontré que l'hème (HE), produite suite à l'oxydation de l'hème provenant de l'hémoglobine (Hb), pourrait être impliquée dans ces deux phénomènes. Lors des infections par *Plasmodium*, les MP entrent en contact avec et internalisent des quantités importantes de ce composé ferrique via la phagocytose de globules rouges (GR) parasités ou abimés ainsi que via l'ingestion d'Hb et/ou d'HE libérées dans le sang suite à la lyse des érythrocytes. *In vitro*, des doses physiologiques d'HE diminuent de manière significative la quantité d'IL-12 sécrétée par les MP dérivés de la moelle osseuse en réponse à une stimulation avec l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le lipopolysaccharide (LPS). L'HE agit principalement sur l'effet synergique de l'IFN- $\gamma$  et ceci d'une manière dépendante de l'interleukine 10 (IL-10), de la MAPK (de l'anglais "mitogen activated protein kinase") p38 et du stress oxydatif. D'autre part, l'utilisation de GR de souris infectées par le Pca ou de GR oxydés, permettant de stimuler une forte érythrophagocytose *in vitro*, a permis de démontrer que l'internalisation d'un nombre important de GR induisait l'apoptose des MP de la lignée J774A.1. La phagocytose des GR conduit à l'internalisation d'une quantité importante d'HE induisant un stress oxydatif impliqué dans la diminution de la viabilité des MP.

Bien que l'activation des cellules TregN et l'inhibition des MP à la suite de l'ingestion d'HE puissent représenter des mécanismes permettant au *Plasmodium* d'échapper au système immunitaire, ces mécanismes immunosuppresseurs pourraient aussi permettre de limiter l'inflammation et la pathologie favorisant ainsi la survie de l'hôte lors de la malaria.

**Mots clefs :** *Plasmodium*, immunosuppression, macrophages, interleukine 12, érythrophagocytose.



# INTRODUCTION

La malaria ou paludisme, maladie causée par le parasite *Plasmodium*, tue chaque année un million de personnes (World Health Organization, 2010). Aucun vaccin efficace pouvant être produit à l'échelle industrielle n'existe pour le moment. De surcroît, le parasite devient progressivement résistant à la plupart des traitements curatifs et prophylactiques actuellement utilisés (World Health Organization, 2009). Finalement, l'éradication du vecteur responsable de la transmission du parasite (l'*Anophèle*) à l'aide d'insecticides a, elle aussi, montré ses limites suite au développement de résistances (Brogdon et McAllister, 2004). Ainsi, le contrôle de la malaria est chaque jour un peu plus difficile. C'est pourquoi il est urgent de mieux comprendre comment le parasite interagit avec notre système immunitaire afin d'élaborer de nouvelles stratégies pour augmenter l'efficacité de la réponse antiparasite, d'identifier de nouvelles cibles pour développer de nouveaux traitements et de mettre au point un vaccin efficace.

Lors d'une première infection, le *Plasmodium* peut causer la mort et/ou peut, en absence de traitement, persister dans le sang et causer des symptômes pendant plusieurs mois avant d'être éliminé par le système immunitaire (Baliraine *et al.*, 2010). Dans les zones de propagation intense, les individus développent une immunité partielle (ou état de prémunition) après plusieurs années d'expositions répétées. Passé l'âge de 5 ans, les infections par *Plasmodium* causent des pathologies relativement bénignes entraînant rarement la mort (Perlmann et Troye-Blomberg, 2000; Soe *et al.*, 2001). Bien que cette immunité permette de contrôler efficacement le nombre de parasites, le *Plasmodium* demeure capable d'infecter les individus tout au long de leur vie et peut persister dans le sang jusqu'à plusieurs mois en absence de traitement (Struik et Riley, 2004). Ainsi, les infections par *Plasmodium* demeurent invalidantes et causent de lourdes pertes économiques.

D'une part, la diversité et la variation antigénique du parasite sont les deux principaux facteurs responsables de l'acquisition lente (plusieurs années) d'une protection contre la malaria (Struik et Riley, 2004; Jangpatarapongsa *et al.*, 2006; Cockburn et Zavala, 2007). Ainsi, les individus doivent rencontrer l'ensemble du répertoire des souches de *Plasmodium* présentes dans la région avant de développer une protection efficace. D'autre part, les

infections par *Plasmodium* sont associées à une sensibilité accrue à certains pathogènes (*Salmonella typhi* (Williamson et Greenwood, 1978), *Herpes Zoster* (Cook, 1985), *VIH* (Hoffman *et al.*, 1999)) et à une réduction de l'efficacité de certains vaccins (Williamson et Greenwood, 1978) suggérant un état de suppression immunitaire généralisé. Il est probable que cet état d'immunosuppression interfère avec le bon fonctionnement de la réponse antiparasite ainsi qu'avec le développement d'une mémoire efficace et durable, ce qui pourrait expliquer la longue persistance du parasite et les réinfections récurrentes même après plusieurs années d'exposition. Mieux comprendre comment les infections par *Plasmodium* inhibent le système immunitaire est d'une importance capitale pour la lutte contre la malaria et plus particulièrement pour le développement de vaccins.

L'immunosuppression pendant la malaria est un phénomène complexe qui semble avoir de multiples causes et qui peut persister plusieurs semaines après l'élimination du parasite (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003). Plusieurs études rapportent que la suppression de la réponse immunitaire est en corrélation directe avec la phase érythrocytaire du cycle de développement du parasite (Ahvazi, Jacobs et Stevenson, 1995; Scorza *et al.*, 1999; Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003). Pour ces raisons, la présente étude a pour objectif d'étudier en détails les mécanismes immunosuppresseurs susceptibles d'affecter certaines populations de cellules immunitaires pendant le développement du *Plasmodium* dans le sang. Un intérêt particulier sera porté au recrutement/activation des cellules TregN ainsi qu'à la modulation de certaines fonctions effectrices et de la viabilité des MP.

Les cellules TregN sont capables d'inhiber la réponse immunitaire et il a été rapporté que l'activation de ces dernières pourrait être responsable de la mortalité associée à certaines infections par *Plasmodium* chez la souris. Certains parasites sont virulents et occasionnent une forte pathologie pouvant conduire à la mort alors que d'autres sont non virulents et provoquent peu de complications (Taylor-Robinson, 1995; Chotivanich *et al.*, 2000; Deans *et al.*, 2006). Bien que la virulence soit partiellement liée à des caractères propres à l'hôte (groupe HLA et anomalies génétiques affectant les GR, par exemple), des facteurs intrinsèques au parasite entrent aussi en ligne de compte (Gupta *et al.*, 1994). Dans ce contexte, une étude, menée à l'aide d'un modèle murin d'infection par *Plasmodium*, a suggéré que les parasites virulents pourraient induire un état d'immunosuppression plus

marqué que leurs homologues non virulents. En 2004, Hisaeda *et al.* ont démontré que l'immunosuppression induite par le parasite virulent *PyL* était supérieure à celle causée par la souche non virulente apparentée *Plasmodium yoelii* 17XNL (*PyNL*) (Hisaeda *et al.*, 2004). L'exacerbation de la suppression semble due à une activation/recrutement des cellules TregN par le parasite virulent puisque l'élimination de ces cellules diminuait significativement l'immunosuppression et permettait aux souris de résoudre l'infection normalement mortelle. Connaissant le caractère bénéfique de l'activation des cellules TregN dans le contrôle des désordres auto-immuns et des inflammations chroniques (Sakaguchi, 2004; Belkaid et Rouse, 2005), les résultats de Hisaeda *et al.* paraissaient surprenants (Hisaeda *et al.*, 2004). En effet, les infections par *Plasmodium* stimulant une forte réponse inflammatoire impliquée dans l'induction de nombreuses pathologies (voir par. 1.1.5.1), l'activation des cellules TregN pourrait représenter un mécanisme protecteur visant à limiter l'inflammation et la pathologie. Ainsi, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'élimination des cellules TregN sur le développement de la pathologie lors des infections par *Plasmodium* en utilisant un modèle murin alternatif de parasites virulents et non virulents apparentés (*PcaDS* et *PcaDK*). En parallèle, l'impact de l'élimination de ces cellules sur l'immunosuppression et sur la cinétique d'infection a été étudié afin d'évaluer les résultats obtenus par Hisaeda *et al.* dans nos modèles d'infection par *Pca*.

Les MP jouent un rôle déterminant dans la résolution de l'infection par *Plasmodium* (voir par. 1.1.4.2). En particulier, ils réduisent la charge parasitaire en phagocytant les GR parasités mais aussi en sécrétant des facteurs solubles permettant de ralentir le développement du *Plasmodium* dans le sang. De plus, les MP produisent de l'IL-12 qui va permettre la différenciation et l'activation des cellules T auxiliaires de type 1 (Th1 de l'anglais « T helper 1 ») dont la présence est essentielle à la résolution des infections par *Plasmodium*. Outre son implication dans la réponse immunitaire antiparasite, l'IL-12 favorise aussi l'érythropoïèse essentielle à la compensation des pertes en GR liées au développement du parasite dans le sang (Dybedal, Larsen et Jacobsen, 1995). Cette double fonction confère une importance particulière à l'IL-12 dans la résolution des infections par *Plasmodium* (voir par. 1.1.4.2, 1.1.5.3 et 1.3.1.3). Malheureusement, de nombreuses études indiquent que plusieurs fonctions effectrices des MP, dont la sécrétion d'IL-12, semblent être inhibées

pendant les infections par *Plasmodium* (voir par. 1.1.6.1, sect. 1.3 et art. 1.4.5). Lors de la malaria, les MP phagocytent de nombreux GR parasités ainsi qu'une quantité importante de GR non parasités ayant subi des dommages oxydatifs (Chang et Stevenson, 2004; Ferreira *et al.*, 2008), ce qui conduit à l'accumulation intracellulaire de nombreux composés ferriques dont le pigment malarique ou hémozoïne (HZ), l'Hb et la forme oxydée de l'hème appelée HE ( $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrine IX). Il a été suggéré que l'ingestion des ces composés pourrait être responsable des dysfonctions affectant les MP pendant les infections par *Plasmodium*. Ainsi, plusieurs études rapportent que l'ingestion d'HZ *in vitro* inhibe fortement la production d'IL-12, la phagocytose et l'activation de la NADPH oxydase (de l'anglais « nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase ») des MP (voir par. 1.3.2.3). Bien que l'HE soit présente en forte concentration dans le sérum des individus infectés et qu'elle soit libérée en quantité importante dans le cytoplasme des MP suite à la dégradation de l'Hb des GR phagocytés, peu d'études ont évalué l'impact de ce composé ferrique pendant la malaria. Cependant, certaines études suggèrent que l'HE pourrait jouer un rôle dans le développement de la pathologie associée aux infections par *Plasmodium* (Chang et Stevenson, 2004; Ferreira *et al.*, 2008) (voir par. 1.3.2.1). Dans cette étude, l'impact de l'HE sur la sécrétion d'IL-12 des MP sera évalué *in vitro* et comparé aux effets inhibiteurs de l'HZ.

En plus des nombreuses dysfonctions affectant les MP, ces derniers présentent une viabilité réduite pendant la malaria. Dans ce contexte, Helmby *et al.* ont démontré que le nombre de MP apoptotiques augmente fortement dans la rate des souris BALB/c infectées par le *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS (*PccAS*) (Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). La proportion de MP apoptotiques semble être en corrélation directe avec la parasitémie (Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). À la vue du nombre élevé de GR phagocytés lors des infections par *Plasmodium* (Chang et Stevenson, 2004), nous avons suggéré que l'érythrophagocytose pourrait être le facteur déclenchant l'apoptose des MP pendant la malaria. L'impact d'une érythrophagocytose robuste et soutenue sur la viabilité des MP sera évalué *in vitro* et un intérêt particulier sera accordé à l'accumulation intracellulaire des composés ferriques décrits précédemment dans les phagocytes.

# CHAPITRE I

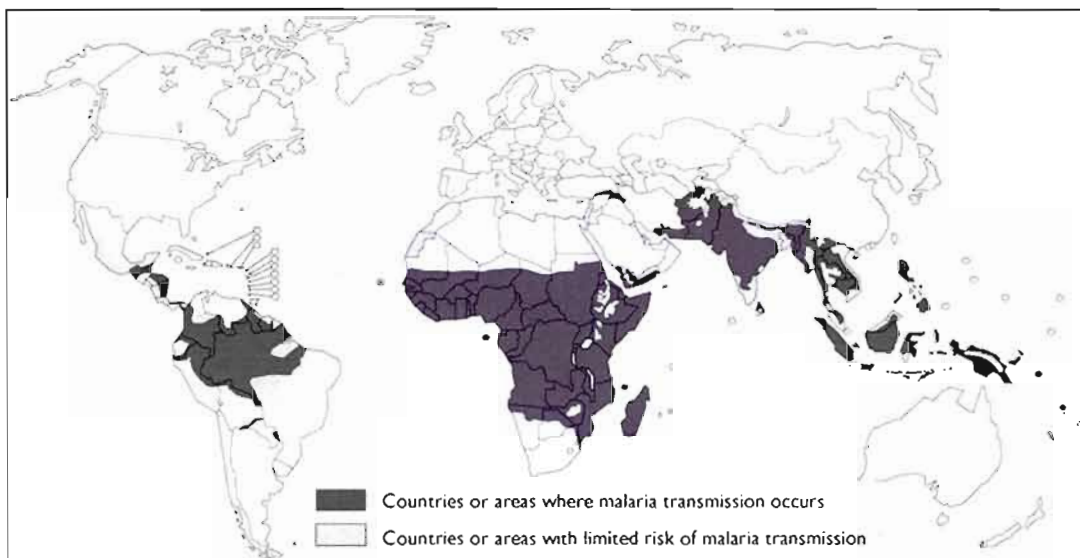
## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1.1 Malaria

#### 1.1.1 Épidémiologie

La malaria ou paludisme est causée par un protozoaire appartenant à l'ordre des *Eucoccidia*, au sous-ordre des *Hemosporidea*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Parmi les cinq sous espèces de *Plasmodium* pouvant infecter l'homme (*P. knowlesi*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*), *P. falciparum* est la plus dangereuse et est responsable de 75% des décès causés par le paludisme (World Health Organization, 2010).

En 2009, le paludisme a causé 1 million de morts pour 250 millions d'infections (World Health Organization, 2010). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la malaria fait partie des trois maladies les plus meurtrières au monde avec la tuberculose et le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Cette pandémie touche 109 pays dont 45 en Afrique (Fig. 1.1). En 2002, 80% des infections étaient répertoriées en Afrique équatoriale. Les pays industrialisés restent largement épargnés avec seulement 16 000 européens et 1 200 américains ayant contracté la malaria suite à un voyage dans une zone à risque (Greenwood et Mutabingwa, 2002).



**Figure 1.1: Pays affectés par la malaria en 2009**

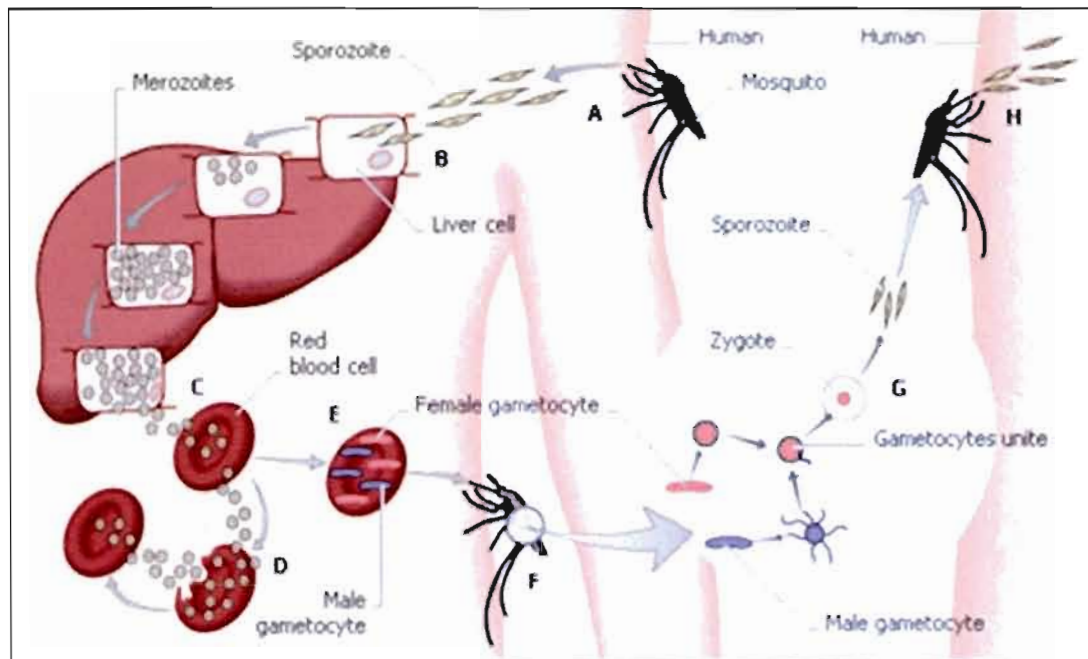
Les infections par *Plasmodium* touchent plus de 100 pays dans le monde dont la majorité se retrouve en Afrique. Cette carte présente la répartition géographique des pays et des zones où les infections par *Plasmodium* sont rapportées de manière régulière ou occasionnelle. Observations réalisées en 2009.

Source : (World Health Organization, 2010)

### 1.1.2. Cycle de vie du parasite

Le parasite doit infecter successivement un hôte vertébré puis un hôte invertébré pour compléter son cycle de développement (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002) (Fig. 1.2). Selon le type de *Plasmodium* considéré, l'hôte vertébré peut être un homme, un rongeur, un primate, une volaille ou un lézard. Cependant, un type de *Plasmodium* n'infecte qu'une seule sorte d'hôte vertébré. En ce qui concerne l'hôte invertébré, c'est toujours un moustique de type *Anophèle*.

Chez l'homme, le cycle de vie du parasite commence par la piqûre d'un *Anophèle* femelle infecté qui injecte des sporozoïtes dans la circulation sanguine (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002). En quelques dizaines de minutes, les parasites rejoignent les cellules hépatiques de l'hôte où ils vont se multiplier et se différencier en mérozoïtes (phase pré-



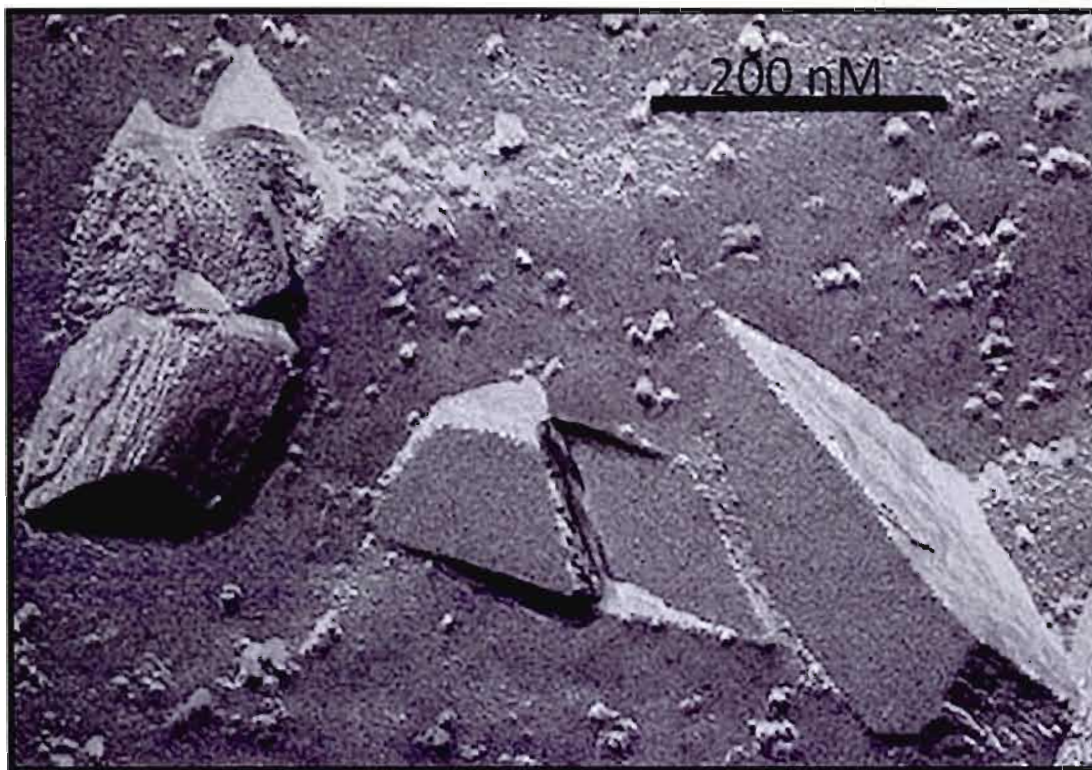
**Figure 1.2: Cycle de développement du *Plasmodium***

Le *Plasmodium* est transmis à l'homme sous forme de sporozoïtes par un moustique (*Anophèle*). Une fois libéré dans la circulation sanguine, le parasite va rejoindre le foie pour se multiplier et se différencier. Suite à cette étape, les mérozoïtes obtenus seront libérés à nouveau dans le sang et infecteront les GR. Lors de ces cycles de multiplication asexuée, une partie des parasites se différenciera en gamétocytes mâles et femelles. Lors du repas de sang du moustique, ces derniers seront ingérés et la fécondation aura lieu au niveau de la muqueuse intestinale de l'*Anophèle*. Le zygote ainsi formé donnera naissance à de nouveaux sporozoïtes qui migreront au niveau des glandes salivaires du moustique afin d'être transmis à l'homme lors du prochain repas de sang de ce dernier.

Source: (<http://encarta.msn.com>)

érythrocytaire) (Schofield et Grau, 2005; Prudencio, Rodriguez et Mota, 2006). Dix à quinze jours plus tard, les hépatocytes infectés éclatent et libèrent les mérozoïtes qui vont rapidement parasiter les GR (phase érythrocytaire) (Wipasa *et al.*, 2002; Haldar *et al.*, 2007). Au cours de son développement dans le GR, le parasite dégrade jusqu'à 80% de l'Hb afin d'assurer sa croissance et sa multiplication (Moore *et al.*, 2006). Pendant ce processus, l'HE de l'Hb est libérée et le parasite neutralise la toxicité de cette molécule en la complexant sous la forme d'un biocristal appelé HZ (Tekwani et Walker, 2005; Hempelmann, 2007) (Fig. 1.3).





**Figure 1.3: Cristaux d’HZ observés au microscope**

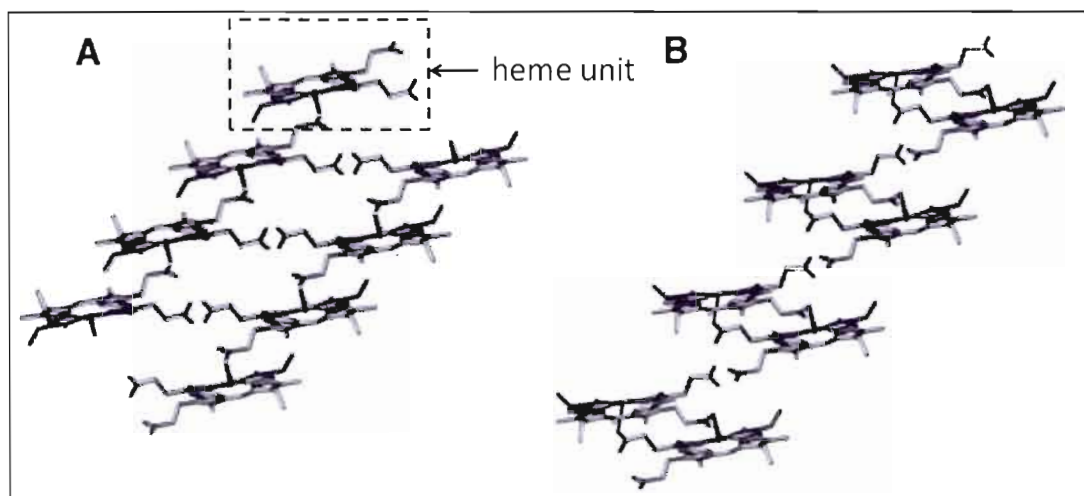
Préparation d’HZ obtenue suite à la lyse de GR parasités par *P. falciparum* par plusieurs cycles de congélation/décongélation. Plusieurs cristaux d’HZ orientés dans des angles différents sont observés.

Source : (Hempelmann, 2007)

Ce pigment brun a été observé pour la première fois en 1847 par Johann Heinrich Meckel chez un patient atteint de « démence » (Meckel, 1847). Dans un premier temps, le pigment a faussement été apparenté à la mélanine et la maladie y étant associée nommée mélanémie (Meckel, 1847; Janjua *et al.*, 2010). Ce n’est qu’après 1880, que ce pigment a été associé à la malaria (Laveran, 1982) et à la dégradation de l’Hb par le parasite (Brown, 1911). Pendant longtemps, l’HZ a été décrite comme un polymère composé de brins d’HE dont les unités étaient reliées entre elles par des liaisons entre le fer d’une unité et une chaîne carboxylique latérale de l’unité suivante (Slater *et al.*, 1991) (Fig. 1.4). Les brins d’HE ainsi formés étaient liés entre eux par des liaisons hydrogènes entre les chaînes carboxyliques



libres des molécules d'HE. Cependant, l'incapacité de trouver une hème polymérase dans le génome du *Plasmodium* et le fait que la solubilisation de l'HE ne donnait pas le profil caractéristique d'un polymère a amené la communauté scientifique à reconsidérer cette hypothèse (Hempelman, 2007). Ainsi, il semble que l'HZ soit en réalité un biocristal dont la formation serait permise par les conditions physicochimiques particulières retrouvées dans la vacuole digestive du parasite (Steinbuchel et Marchessault, 2005; Hempelman, 2007). Ce biocristal serait composé de dimères d'HE, formés par la liaison réciproque de l'atome de fer d'une unité avec une chaîne carboxylique latérale de l'autre unité, reliés entre eux par des liaisons hydrogènes entre les chaînes carboxyliques libres (Fig. 1.4). *In vivo*, la formation d'HZ semble nécessiter un pH acide (autour de 5), des lipides pour catalyser la réaction et certaines protéines comme les HRP (de l'anglais « histidine rich proteins ») ou la HDP (de l'anglais « heme detoxification protein »)(Stiebler *et al.*, 2011).



**Figure 1.4: Les deux modèles structuraux de l'HZ**

La structure de l'HZ repose sur la liaison du noyau de fer d'une molécule d'HE avec la chaîne carboxylique latérale de la molécule suivante. (A) Le premier modèle proposait que l'HZ était un polymère d'HE. (B) Le modèle actuel suggère que l'HZ est un biocristal composé de dimères d'HE. Dans ces deux modèles, il semblerait que les brins d'HE ainsi formés s'associent entre eux grâce à des interactions hydrophobes entre les noyaux tétrapyrroliques présents sur chacune des molécules d'HE.

Source : (Steinbuchel et Marchessault, 2005)

L'HZ s'accumule dans le GR tout au long du développement du parasite mais le biocrystal est majoritairement produit lors des stades terminaux de différenciation du *Plasmodium* (trophozoïtes et schizontes) (Moore *et al.*, 2006). Tous les deux à trois jours, les GR éclatent et libèrent l'HZ, l'Hb non-digérée et les parasites qui vont infecter de nouveaux érythrocytes (Haldar *et al.*, 2007) (Fig. 1.2). L'Hb est ensuite oxydée en méthémoglobine (metHb) et libère l'HE dans le sang (Atamna et Ginsburg, 1993; Wagener *et al.*, 2003; Atoji *et al.*, 2006). L'accumulation de ces composés dans la circulation sanguine provoque une réponse inflammatoire importante impliquant la sécrétion de TNF- $\alpha$  (de l'anglais « tumor necrosis factor alpha ») par les monocytes et les MP (Kwiatkowski, 1993). Cette réponse inflammatoire est responsable des fièvres cycliques caractéristiques de la malaria (Ferreira *et al.*, 2008). De plus, l'Hb et l'HE libres oxydent la paroi des GR non parasités provoquant leur lyse et entraînant ainsi la libération de composés ferriques additionnels dans le sang (voir art. 1.4.4). Au cours de ces cycles de multiplication asexuée au sein des GR, certains parasites se différencient en gamètes mâles ou femelles et sont ingérés par l'*Anophèle* (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002) (Fig. 1.2). Les gamètes vont fusionner dans l'intestin du moustique puis migrer vers les glandes salivaires où ils termineront leur maturation en sporozoïtes (Fig. 1.2). Au prochain repas de sang de l'*Anophèle*, un nouvel hôte vertébré sera infecté et le cycle recommencera (Miller *et al.*, 2002).

### 1.1.3. Modèles d'étude expérimentaux : avantages et faiblesses

Afin de pouvoir étudier les infections par *Plasmodium in vivo* en laboratoire de manière simple et peu coûteuse, différents modèles d'infection murins ont été mis en place. Ces modèles utilisent quatre espèces de *Plasmodium* qui ont été isolées de différentes espèces de rongeurs en Afrique (*Thamnomys rutilans* et *Grammomys surdaster* principalement) : *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. vinckei* et *P. yoelii* (Tabl. 1.1). Ces parasites ont comme avantage de causer des infections présentant les mêmes étapes et les mêmes stades de développement que les parasites humains (Tabl. 1.1). De plus, l'organisation du génome, la physiologie et le métabolisme des parasites murins sont similaires à ceux des espèces de *Plasmodium* infectant l'homme (Taylor-Robinson, 2010). Les infections des rongeurs sauvages par ces parasites ressemblent fortement aux infections humaines que ce soit en termes de persistance du parasite, de niveau de parasitémie (inférieur à 10%) et du développement de l'immunité contre la réinfection (Chatterjee *et al.*, 2006). Les rongeurs sauvages étant difficiles à maintenir en captivité et présentant une variabilité génétique trop importante, les parasites murins isolés en sol africain ont été adaptés à diverses souches de souris de laboratoire (Carter et Walliker, 1976; Landau et Boulard, 1978; Taylor-Robinson, 1995). Les modèles d'infection par *Plasmodium* utilisant les souris de laboratoire diffèrent légèrement des infections humaines. Alors que les parasites humains occasionnent des parasitémies inférieures à 10%, les modèles murins employant les souris de laboratoire peuvent conduire à l'infection de plus de 50% des GR (Taylor-Robinson, 1995). Il a aussi été observé que les souris de laboratoire développent une immunité complète contre la réinfection après une seule infection. De son côté, l'homme a besoin de plusieurs années d'exposition au *Plasmodium* pour acquérir une protection partielle contre la réinfection (Taylor-Robinson, 1995).

**Tableau 1.1 : Comparaison des caractéristiques des quatre espèces de *Plasmodium* employées dans les modèles expérimentaux murins et des *Plasmodium* infectant l'homme**

	<i>berghei</i>	<i>yoelii</i>	<i>chabaudi</i>	<i>vinckei</i>	Human parasites
Merozoites per schizont	12-18	12-18	6-8	6-12	8-16 (32)
Reticulocyte preference	Yes	Yes	No	No	Yes/No
Synchronous blood infection	No	No	Yes	Yes	Yes/No
Optimum temperature mosquito transmission	19-21	23-26	24-26	24-26	>26
Oocyst size (µm)	<45	60-75	50	45-54	50-60
Sporozoites in glands (days after infection)	13-14	9-11	11-13	10-13	dependent on temperature
Mean diameter pre-erythrocytic schizonts (µm)	27	35-50	38-45	35	45-60
Duration of pre-erythrocytic cycle (hours)	48-52	43-48	50-58	60-72	6-15 days
Duration of asexual blood stage cycle (hours)	22-24	18	24	24	48-72
Developmental time gametocytes (hours)	26-30	27	36?	27	48h-12days
Developmental time ookinete (hours)	18-24	18-24	18-24?	18-24?	12-24
Microgamete (size in µm)	15	16	-	-	16-25
Sporozoite (size in µm)	11-12	14-16	10-15	11-21	10-14
Ookinete (size in µm)	10-12	11	-	8-10	11-20

Les espèces *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. vinckei* et *P. berghei* sont capables d'infecter les rongeurs et sont employées dans de nombreux modèles murins d'infection par *Plasmodium*. Ces parasites présentent de grandes similitudes avec leurs homologues infectant l'homme mais aussi quelques différences. Ce tableau présente une comparaison des différentes espèces de parasites murins et des parasites humains.

Source : (<http://www.lumc.nl>)

### 1.1.3.1. Différences entre le système immunitaire de l'homme et de la souris

Bien que le séquençage des génomes de l'homme et de la souris ait permis de démontrer que seulement 300 gènes semblent être uniques à l'une ou l'autre des espèces, il n'en reste pas moins que ces deux espèces ont divergé il y a 75 millions d'années et présentent par conséquent certaines différences (Mestas et Hughes, 2004). En particulier, les systèmes immunitaires de l'homme et de la souris, bien qu'ils soient très similaires, recèlent certaines différences dues au fait que ces deux espèces ont évolué dans des environnements présentant des pathogènes différents (pour une liste exhaustive voir (Mestas et Hughes, 2004)). Ainsi, contrairement à l'homme où l'hématopoïèse au niveau de la rate n'opère plus après la naissance, ce processus continue tout au long de la vie chez la souris. De ce fait, les souris sont capables de produire de nouveaux GR au niveau de la rate tout au long de leur vie ce qui pourrait les rendre moins sensibles au développement de l'anémie lors des infections par *Plasmodium* que les hommes (Lamikanra *et al.*, 2007). On peut aussi remarquer que l'homme présente une proportion de neutrophiles sanguins plus importante que la souris, que l'expression des TLR et des récepteurs Fc sur les cellules hématopoïétiques varie entre les deux espèces et que les stimuli induisant la production d'oxyde nitrique (NO de l'anglais « nitric oxide ») par les MP sont différents (Mestas et Hughes, 2004). Ces différences pourraient avoir des répercussions importantes dans l'initiation et l'efficacité de la réponse immunitaire innée dirigée contre le *Plasmodium* et moduler le contrôle du parasite. Par conséquent, les résultats obtenus avec les modèles murins sont à extrapoler à l'homme avec attention. À ce sujet, une citation intéressante a été tirée d'une publication de Nacher *et al.* (Nacher, 2008) concernant la pertinence de l'utilisation des modèles animaux en recherche: « Mice lie and monkeys do not always tell the truth ». Ceci explique pourquoi certaines thérapies vont être efficaces chez la souris et n'avoir aucun effet chez l'homme.

### 1.1.3.2. *Plasmodium chabaudi* : un modèle de choix

Bien que très proches en terme de physiologie et de morphologie, les quatre souches de parasites murins décrites précédemment induisent des infections sensiblement différentes les unes des autres en ce qui concerne le temps des étapes du cycle de développement, le nombre de parasites générés, le type de GR infecté ou encore le caractère synchrone ou non du développement du parasite (Tabl. 1.1). Ces quatre sous espèces de *Plasmodium* donnent lieu à des infections d'intensité variable et ceci semble dépendre à la fois de la souche de parasite mais aussi de l'hôte employés dans le modèle d'infection (Tabl. 1.2) (Li, Seixas et Langhorne, 2001). Les modèles employant l'espèce *Plasmodium chabaudi* sont considérés comme les modèles reproduisant le plus fidèlement les infections par *Plasmodium falciparum*. En effet, le *P. chabaudi* et le *P. falciparum* infectent tous les GR et ne sont pas restreints à l'infection des normocytes, se développent de manière synchrone *in vivo* et donnent lieu à des épisodes de recrudescence après la résolution du premier pic d'infection (Hernandez-Valladares, Naessens et Iraqi, 2005; Taylor-Robinson, 2010). Pour ces diverses raisons, nous avons choisi d'utiliser le *P. chabaudi* pour nos études.

**Tableau 1.2 : Virulence des espèces de *Plasmodium* employées dans les modèles murins en fonction du patrimoine génétique de l'hôte**

Parasite	Strain	Mouse strain	Lethality	Experimental use
<i>P. chabaudi chabaudi</i>		CBA C57BL/6 BALB/c	NL	Immune mechanisms Malaria associated clinical signs/sequestration
	AS	129sv A/J DBA/2	L	Pathogenesis Chemotherapy Resistance and susceptibility
	CB	CBA C57BL/6		Immune mechanisms
<i>P. chabaudi adami</i>		BALB/c C57BL/6	NL	Immune mechanisms
<i>P. berghei</i>	ANKA	BALB/c C57BL/6 CBA	L	Pathogenesis ECM/sequestration
	K173	BALB/c CBA DBA C57BL/6	L	Pathogenesis Control for ECM
<i>P. yoelii</i>	17XL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA Swiss	L	Immune mechanisms
			L	Pathogenesis ECM/ sequestration
	YM	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	L	Vaccine Pathogenesis Hypoglycaemia
	17XNL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	NL	Immune responses Vaccination
				Immune mechanisms
<i>P. vinckei vinckei</i>		BALB/c	L	Chemotherapy Pathogenesis Malaria associated clinical signs/sequestration
<i>P. vinckei petteri</i>	CR	C57BL/6 BALB/c	NL	Immune mechanisms

Les espèces *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. vinckei* et *P. berghei* provoquent des infections plus ou moins dangereuses pour la souris. Dépendamment de la souche de souris et de la souche de *Plasmodium*, les infections peuvent être létales ou le parasite peut être éliminé plus ou moins rapidement sans mettre en danger la vie de la souris.

Source : (Li, Seixas et Langhorne, 2001)

#### 1.1.4. Contrôle de la malaria

Bien que la malaria soit étudiée depuis maintenant plus d'un siècle, les moyens pour lutter contre cette maladie restent limités. D'une part, les traitements curatifs et prophylactiques sont de moins en moins efficaces à cause de l'émergence rapide de souches de *Plasmodium* résistantes à un, voire plusieurs médicaments (Ferraroni, Alencar et Shrimpton, 1983; Isaac-Renton *et al.*, 1983; Cowman et Foote, 1990; Farooq et Mahajan, 2004). Ce phénomène de résistance et la difficulté à se procurer les médicaments adéquats dans les pays en voie de développement sont responsables de la quasi-totalité des décès. D'autre part, l'élaboration d'un vaccin efficace se fait toujours attendre malgré les nombreux essais déjà réalisés dans les zones endémiques (Desowitz, 2000; Walgate, 2001). Seul un vaccin utilisant des sporozoïtes irradiés a permis d'induire une protection efficace chez l'homme (90 à 95% des personnes protégées sur une durée de dix mois) (Clyde *et al.*, 1973; Clyde *et al.*, 1973). Cependant, sa production à l'échelle industrielle étant trop coûteuse, ce vaccin ne peut être utilisé que comme outil de laboratoire. Contrairement au vaccin contre la Poliomyélite qui a été mis au point sans connaître en détail la maladie, il semblerait que, pour celui contre la malaria, des connaissances plus approfondies sur le parasite et la manière dont il interagit avec le système immunitaire de l'hôte soient nécessaires.

#### 1.1.5. Protection et réponse immunitaire contre le *Plasmodium*

##### 1.1.5.1. État de prémunition

La réponse immunitaire générée pendant la malaria ne permet pas d'acquérir une protection complète contre les infections ultérieures par le *Plasmodium*. Ainsi, dans les zones de transmission intense, les personnes peuvent être réinfectées tout au long de leur vie. Néanmoins, après plusieurs années d'expositions répétées au parasite, un état de prémunition (paludisme stable) s'établit (Perlmann et Troye-Blomberg, 2000; Soe *et al.*, 2001). Les personnes restent sensibles aux infections mais ces dernières donnent lieu à une pathologie de plus en plus atténuée (faible parasitémie et anémie modérée), voire inexistante (infection asymptomatique) et à une mortalité quasi nulle (Perignon et Druilhe, 1994; Brown *et al.*,



2000; Perlmann et Troye-Blomberg, 2000). Bien que cet état de prémunition limite de manière significative la pathologie, l'immunité n'est pas complète et le parasite peut se multiplier au sein de l'hôte permettant ainsi sa propagation. L'acquisition de l'état de prémunition nécessite plusieurs années d'infections et son maintien demande un contact régulier avec le parasite. En effet, la protection contre le *Plasmodium* disparaît si l'individu n'est pas réinfecté par le parasite pendant une année (Obi *et al.*, 2010). Le mécanisme responsable de cette perte d'immunité n'est pas connu mais il est probable que la survie des cellules mémoires anti-*Plasmodium* nécessite un contact régulier avec les antigènes du parasite.

#### **1.1.5.2. Réponse immunitaire contre le *Plasmodium***

Le développement du parasite au sein de l'hôte est complexe. Le *Plasmodium* passe par divers stades de développement (sporozoïte, mérozoïte puis gamétocyte) et infecte successivement les hépatocytes (phase pré-érythrocytaire) puis les GR (phase érythrocytaire). La présente étude étant basée uniquement sur l'étude de la phase érythrocytaire du cycle de développement du parasite, la réponse immunitaire contre le parasite lors de son développement dans le foie ne sera pas abordée. La réponse contre la phase pré-érythrocytaire du cycle de développement du *Plasmodium* a été détaillée de manière exhaustive ailleurs (Ferreira *et al.*, 1986; Hoffman *et al.*, 1986; Stewart *et al.*, 1986; Schofield *et al.*, 1987; Schofield *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1990; Malik *et al.*, 1991; John *et al.*, 2004). L'efficacité de la réponse immunitaire contre la phase érythrocytaire du cycle de développement du *Plasmodium* repose sur un ensemble complexe de mécanismes protecteurs dépendants et indépendants des anticorps (Troye-Blomberg, Berzins et Perlmann, 1994; Perlmann et Troye-Blomberg, 2000; Wipasa *et al.*, 2002).

#### **Nécessité d'une réponse Th1 soutenue suivie d'une réponse Th2 :**

La résolution des infections par *Plasmodium* nécessite l'intervention successive des cellules T CD4<sup>+</sup> (de l'anglais « cluster of differentiation 4<sup>+</sup> ») auxiliaires Th1 puis Th2 (Stevenson et Tam, 1993; Taylor-Robinson et Phillips, 1994; Troye-Blomberg, Berzins et Perlmann, 1994). De manière générale, la différence entre les cellules Th1 et Th2 est basée

sur le profil des cytokines qu'elles produisent. Les cellules Th1 sécrètent majoritairement de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2 alors que les cellules Th2 produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10 (Romagnani, 1999; Romagnani, 2000). La différenciation en cellules Th1 est favorisée par la présence d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 lors de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> auxiliaires, alors que celle des cellules Th2 dépend de l'IL-4 et de l'IL-6 (Romagnani, 1999). Les cellules Th1 augmentent les capacités phagocytaires et bactéricides des MP mais induisent aussi leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Wipasa *et al.*, 2002). De leur côté, les cellules Th2 favorisent la production de classes d'anticorps associées aux allergies et aux infections par les helminthes (Immunoglobuline G (IgG) 4 et IgE chez l'homme, IgG1 et IgE chez la souris) (Wipasa *et al.*, 2002). Les cellules Th1 participent elles aussi à la production d'anticorps. Ces derniers sont cytophyliques (IgG1 et IgG3 chez l'homme et IgG2a chez la souris) (Wipasa *et al.*, 2002) et permettent d'opsoniser les pathogènes et de favoriser leur phagocytose par les MP mais aussi d'induire la sécrétion de facteurs solubles ralentissant le développement des pathogènes. Nous reviendrons plus en détails sur l'importance des anticorps cytophyliques lors des infections par *Plasmodium* dans la section suivante.

L'utilisation de modèles murins a permis de déterminer qu'une réponse Th1 soutenue, permettant notamment d'activer les MP grâce à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , est nécessaire au contrôle du parasite en début d'infection. En effet, les souris C57BL/6, qui sont résistantes aux infections par le *PccAS*, présentent une réponse Th1 soutenue qui laisse place à une réponse Th2 lorsque le pic de parasitémie a été contrôlé (Stevenson et Tam, 1993). En revanche, les souris A/J qui succombent aux infections par ce même parasite induisent une courte réponse Th1 qui est rapidement remplacée par une réponse de type Th2 (Stevenson et Tam, 1993). Cette incapacité à maintenir une réponse de type Th1 importante pourrait être liée au fait que les souris A/J sont connues pour avoir une activité réduite des cellules NK (Li, Seixas et Langhorne, 2001). Ces cellules étant les principales productrices d'IFN- $\gamma$  en début d'infection, leur faible activité pourrait conduire à une production réduite d'IL-12 favorisant ainsi le développement d'une réponse de type Th2 (Li, Seixas et Langhorne, 2001). En fin d'infection, la réponse Th2 et plus particulièrement la sécrétion d'anticorps sont tout aussi importantes que la réponse Th1 nécessaire en début d'infection. En effet, les souris

dépourvues de cellules B sont incapables d'éliminer complètement le *PccAS* et développent des infections chroniques (Taylor-Robinson et Phillips, 1994; von der Weid, Honarvar et Langhorne, 1996; Langhorne *et al.*, 1998). L'importance des anticorps dans la protection contre le *Plasmodium* a aussi été prouvée chez l'homme. Dans ce contexte, il a été démontré que le transfert passif des anticorps d'un individu immun à un individu n'ayant jamais rencontré le *Plasmodium* permettait de protéger ce dernier (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990). De plus, des études épidémiologiques ont aussi mis en évidence une corrélation entre les concentrations élevées d'IgG1 et IgG3 spécifiques du *Plasmodium* et les individus présentant une parasitémie réduite et une pathologie faible. (Bouharoun-Tayoun et Druilhe, 1992; Aribot *et al.*, 1996; Egan *et al.*, 1999; Oeuvery *et al.*, 2000; Aucan *et al.*, 2001). Après plusieurs années d'exposition au parasite, la quantité, l'avidité et l'affinité des anticorps deviennent très élevées ce qui coïncide avec l'acquisition de l'état de prémunition (Cohen, Mc et Carrington, 1961; Druilhe et Khusmith, 1987; Bouharoun-Tayoun et Druilhe, 1992; Ferreira *et al.*, 1996; John *et al.*, 2004; Achtman *et al.*, 2007; Suarez-Mutis *et al.*, 2007).

Les informations décrites à l'instant et provenant de l'utilisation de modèles murins d'infection par *Plasmodium* semblent refléter de manière assez fidèle ce qu'il se passe chez les patients atteints de la malaria (Angulo et Fresno, 2002). Dans ce contexte, il a notamment été démontré que les patients présentant une pathologie modérée produisent significativement plus d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  que les patients développant une pathologie sévère (Luty *et al.*, 1999; Luty *et al.*, 2000; Li, Seixas et Langhorne, 2001). De plus, de manière générale, le niveau d'IL-12 sérique est inversement corrélé avec la parasitémie (Luty *et al.*, 2000). L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  étant les deux cytokines clefs dans l'induction d'une réponse de type Th1, ces études tendent à supporter le fait que, tout comme dans les modèles murins, une forte réponse de type Th1 favorise la résolution des infections par *Plasmodium* chez l'homme. En parallèle, il a aussi été démontré que les patients présentant une réponse de type Th2 plus prononcée que les autres semblent développer des pathologies plus sévères (Perlmann *et al.*, 1999). Bien que cela demeure encore controversé, il semblerait que les infections par les helminthes tendent à rendre les individus plus sensibles aux infections par *Plasmodium* (Nacher, 2008). Les infections par les helminthes étant connues pour induire une forte réponse de type Th2 ces études souligneraient encore une fois l'importance d'une forte réponse de type Th1 pour

éliminer efficacement le *Plasmodium*. Ainsi, la résolution de l'infection par *Plasmodium* dépend d'un équilibre finement régulé entre les réponses Th1 et Th2 et de l'intensité de ces dernières. Chacune de ces réponses contribue à l'immunité contre le *Plasmodium* à des moments distincts de l'infection. Ainsi, le passage de la réponse Th1 à la réponse Th2 est primordial et doit être réalisé au moment adéquat. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans le passage de la réponse Th1 à la réponse Th2 demeurent inconnus.

#### Cellules clefs dans la protection contre le *Plasmodium*:

Comme décrit à l'instant, les cellules B et les anticorps qu'elles produisent jouent un rôle déterminant dans la protection contre le *Plasmodium*. D'une part, la fixation des anticorps sur les récepteurs Fc (FcR) des MP va induire la sécrétion de facteurs ralentissant le développement du parasite au sein des GR. Ce phénomène est appelé ADCI pour « antibody dependent cellular inhibition » et il a été démontré que l'un des facteurs responsables de l'inhibition était le TNF- $\alpha$  (Druilhe et Perignon, 1994; Perignon et Druilhe, 1994; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995). D'autre part, les anticorps opsonisent les parasites et les GR parasités afin de faciliter leur élimination par les leucocytes (Ferrante *et al.*, 1990; Kumaratilake *et al.*, 1992; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Kumaratilake *et al.*, 1997; Kumaratilake et Ferrante, 2000). Ce mécanisme est appelé ADCC pour « antibody dependent cellular cytotoxicity » et plusieurs cellules y participent. Suite à la reconnaissance des anticorps associés aux pathogènes, les cellules NK produisent de l'IFN- $\gamma$  et libèrent des perforines et des granzymes qui vont lyser le pathogène. De leur côté, les MP et les neutrophiles vont phagocyter les pathogènes opsonisés et dégrader ces derniers dans leurs phagolysosomes suite à l'activation de la flambée oxydative. Pour finir, la fixation des anticorps associés aux pathogènes sur les récepteurs Fc des granulocytes va entraîner leur dégranulation et la destruction des agents infectieux. Chez l'homme, Druilhe *et al.* suggèrent que l'ADCC a un impact mineur sur le contrôle de la parasitémie comparativement à l'ADCI (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995). Enfin, les anticorps vont permettre de limiter la mobilité du parasite et l'empêcher d'envahir de nouveaux GR (Wahlin *et al.*, 1984; Udomsangpetch *et al.*, 1986). Les cellules T et plus particulièrement les cellules T CD4<sup>+</sup> semblent importantes elles aussi pour l'élimination du parasite (Troye-Blomberg, Berzins et Perlmann, 1994; van der Heyde *et al.*, 1994). En effet, des expériences menées avec des souris SCID, dépourvues

de cellules B et T, ont montré que ces souris étaient incapables de résoudre les infections par *Pca* (van der Heyde *et al.*, 1994). En revanche, l'administration de cellules T d'un animal normal permet à ces souris d'éliminer complètement le parasite (van der Heyde *et al.*, 1994). Des expériences additionnelles menées avec des souris reconnues pour être dépourvues de cellules B (souche JHD) et débarrassées de leurs cellules T CD4<sup>+</sup> ont permis de mettre en évidence le fait que ces dernières étaient essentielles à la résolution de l'infection (van der Heyde *et al.*, 1994). Ainsi, il semblerait que l'impact des cellules CD8<sup>+</sup>, comparativement à celui des cellules CD4<sup>+</sup>, soit réduit dans la lutte contre la phase érythrocytaire du cycle de développement du parasite (Troye-Blomberg, Berzins et Perlmann, 1994; van der Heyde *et al.*, 1994). Les cellules T vont jouer leur rôle déterminant en sécrétant des cytokines permettant d'activer les cellules effectrices de l'immunité (Wipasa *et al.*, 2002).

#### Cytokines importantes dans la protection contre le *Plasmodium*:

Parmi les nombreux messagers chimiques impliqués dans la réponse immunitaire contre le parasite, les cytokines pro-inflammatoires IL-12, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  jouent un rôle prépondérant (Angulo et Fresno, 2002; Wipasa *et al.*, 2002).

L'IL-12, sécrétée majoritairement par les phagocytes, est peut-être la cytokine la plus importante dans la réponse immunitaire puisqu'elle se trouve à l'origine de la sécrétion de nombreuses cytokines ayant des effets divers et variés. En effet, l'IL-12 va induire la sécrétion d'IFN- $\gamma$  chez les cellules NK (de l'anglais « natural killer ») ainsi que chez les cellules T (Gazzinelli, 1996) et ainsi induire l'expression d'autres médiateurs chimiques dont le TNF- $\alpha$  chez les MP (Su et Stevenson, 2000). De plus, l'IL-12 est le principal inducteur de la réponse de type Th1 (Romagnani, 2000). La neutralisation de cette cytokine à l'aide d'anticorps a démontré qu'elle était responsable de la production d'IFN- $\gamma$  et était impliquée dans la protection lors des infections par *Plasmodium berghei* NK65 chez les souris C57BL/6 (Yoshimoto *et al.*, 1998). Plusieurs études, menées avec différents modèles murins et simiens d'infection par *Plasmodium*, ont démontré que l'ajout d'IL-12 recombinante permettait un meilleur contrôle du parasite (Sedegah, Finkelman et Hoffman, 1994; Hoffman *et al.*, 1997; Mohan, Sam et Stevenson, 1999; Normaznah *et al.*, 1999). Les effets protecteurs de l'IL-12 recombinante sont dus à une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de NO lors

des infections par *Plasmodium* (Sedegah, Finkelman et Hoffman, 1994; Stevenson *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 1997).

De son côté, l'IFN- $\gamma$  active les MP conduisant à une augmentation de leur capacité phagocytaire et de leur capacité à détruire le *Plasmodium* possiblement via la production de NO (Ockenhouse, Schulman et Shear, 1984; Ockenhouse et Shear, 1984; Jacobs, Radzioch et Stevenson, 1996) et de ROS (Janeway *et al.*, 2001). L'importance de l'IFN- $\gamma$  a été soulignée par une étude épidémiologique montrant que les individus atteints d'une malaria sévère produisent cette cytokine en faible quantité comparativement aux individus atteints de formes bénignes de la maladie (Luty *et al.*, 1999). De plus, il a aussi été démontré que les souris déficientes en IFN- $\gamma$  étaient plus sensibles aux infections par *PccAS* que ce soit en terme de mortalité et de morbidité (Yoneto *et al.*, 1999; Su et Stevenson, 2000). Les souris déficientes en IFN- $\gamma$  développent principalement une réponse immunitaire de type Th2 associée à une susceptibilité aux infections par *Plasmodium* (Balmer, Alexander et Phillips, 2000; Su et Stevenson, 2000).

La troisième cytokine clef dans la réponse immunitaire contre le *Plasmodium* qui sera abordée ici est le TNF- $\alpha$ . Cette cytokine dont la production est accrue pendant la malaria (Luty *et al.*, 2000; Perkins, Weinberg et Kremsner, 2000) est induite suite à l'activation des phagocytes par l'IFN- $\gamma$  (Su et Stevenson, 2000) et/ou la fixation des PAMP (de l'anglais « pathogen-associated molecular pattern ») du *Plasmodium* sur les récepteurs de l'immunité innée de ces mêmes cellules (Schofield et Hackett, 1993; Pichyangkul, Saengkrai et Webster, 1994). La neutralisation de cette cytokine rend les souris C57BL/6 sensibles aux infections par le *PccAS* soulignant son importance dans le contrôle du parasite (Jacobs, Radzioch et Stevenson, 1996). De manière importante, le moment où est produite cette cytokine est déterminant. Ainsi, contrairement à la souche de souris C57BL/6 dont la production TNF- $\alpha$  est précoce, la souche de souris A/J sécrète cette cytokine beaucoup plus tardivement et succombe à l'infection par *PccAS* (Jacobs, Radzioch et Stevenson, 1996; Jacobs, Radzioch et Stevenson, 1996). Parmi les actions du TNF- $\alpha$ , on peut nommer son rôle dans le développement de l'inflammation, sa capacité à inhiber la croissance du parasite et son pouvoir activateur sur la sécrétion de NO (Haidaris *et al.*, 1983; Butcher et Clark, 1990; Jacobs, Radzioch et Stevenson, 1996).

D'après les différentes études présentées ici, les MP semblent jouer un rôle effecteur déterminant dans la réponse contre la phase érythrocytaire de développement du *Plasmodium*. En effet, que ce soit suite à l'activation des cellules Th1 sécrétant l'IFN- $\gamma$  ou suite à la production d'anticorps par les cellules B, ce sont les MP qui sont les cellules effectrices terminales qui vont détruire les parasites et/ou ralentir leur développement. De plus, les MP sont une source importante d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  dont les effets protecteurs ont été décrits à l'instant.

#### 1.1.5.3. Mécanismes d'évasion employés par le *Plasmodium*

Afin de réduire l'efficacité de la réponse immunitaire et permettre sa survie, le *Plasmodium* emploie de nombreuses stratégies. Certaines protéines membranaires du parasite comme la protéine CS (pour « circumsporozoite protein ») sont hautement polymorphiques (McCutchan, Good et Miller, 1989). Ainsi, une réponse immunitaire dirigée contre la protéine CS d'un parasite donné ne sera pas ou peu efficace contre la même protéine présente à la surface d'une autre souche de *Plasmodium*. D'autres protéines comme la PfEMPI (pour « *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 ») subissent des variations antigéniques fréquentes (Barbour et Restrepo, 2000; Li, Seixas et Langhorne, 2001). Grâce à ce mécanisme, un même parasite va pouvoir changer de manière très régulière la structure des protéines PfEMPI qu'il exprime. Ainsi, les anticorps spécifiques d'une version de la PfEMPI du *Plasmodium* sont rapidement rendus inefficaces puisqu'ils sont incapables de reconnaître la nouvelle version de cette même protéine. Certaines protéines dont la protéine MSP-1 (pour « merozoite surface protein ») sont aussi capables d'induire la production d'anticorps non protecteurs qui vont recouvrir la surface de la protéine et empêcher la fixation des anticorps actifs (Li, Seixas et Langhorne, 2001). Un dernier mécanisme permettant au *Plasmodium* d'échapper au système immunitaire consiste à se débarrasser de ses protéines de surface lorsqu'elles sont reconnues par le système immunitaire (phénomène connu sous le nom de « shedding ») (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

### 1.1.6. Pathologies associées à la malaria

Suite à l'infection par le *Plasmodium*, la pathologie ne se manifeste pas immédiatement (Schofield et Grau, 2005). Les symptômes n'apparaissent que lorsque le parasite a complété son cycle pré-érythrocytaire (dans le foie) et qu'il rejoint le sang pour envahir les GR. Les nausées et les fièvres cycliques caractéristiques de la malaria sont dues à la lyse synchronisée à intervalles réguliers (48 à 72 h selon la sous-espèce de *Plasmodium* considérée) des GR parasités libérant divers composés pro-inflammatoires dans la circulation sanguine (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002; Ferreira *et al.*, 2008). La malaria est associée à divers symptômes plus ou moins graves dont une fatigue extrême, des troubles respiratoires, des œdèmes pulmonaires, des convulsions, des risques de collapsus cardiovasculaire, des saignements anormaux, la jaunisse (reflétant un dysfonctionnement hépatique), une hémoglobinurie, une anémie sévère et des pertes de conscience pouvant aller jusqu'au coma (reflétant une hypoxie du cerveau) (Ferreira *et al.*, 2008). Moins de 1 à 2% des infections par *Plasmodium* sont létales (Ferreira *et al.*, 2008) et la quasi-totalité des décès causés par la malaria est due au développement d'une anémie sévère ou à l'hypoxie du cerveau aussi appelée malaria cérébrale (MC). Malgré la faible mortalité associée aux infections par *Plasmodium*, la malaria cause une forte morbidité responsable de plus de 40% des hospitalisations dans les régions endémiques (Perlmann et Troye-Blomberg, 2000).

#### 1.1.6.1. Implication de l'inflammation dans le développement de la pathologie

L'inflammation importante associée à la réponse immunitaire contre le *Plasmodium* est en grande partie responsable de la pathologie associée à la malaria. En effet, de nombreuses molécules pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$ , la lymphotoxine (ou TNF- $\beta$  de l'anglais « tumor necrosis factor  $\beta$  »), l'IL-1, l'IL-18, l'IFN- $\gamma$ , le MIF (de l'anglais « macrophage migration inhibitory factor ») et le NO sont produites en quantité importante lors des infections par *Plasmodium* (Tachado *et al.*, 1997; Wipasa *et al.*, 2002; Chang et Stevenson, 2004; Lyke *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008). Bien que ces cytokines permettent de contrôler la parasitémie (voir par. 1.1.4.2), leur forte concentration cause aussi des lésions dangereuses pour l'hôte (Grau *et al.*, 1987; Clark et Chaudhri, 1988; Grau *et al.*, 1989; Vassalli, 1992; Yanez *et al.*, 1996; Cross et Langhorne, 1998; Wipasa *et al.*, 2002; Artavanis-Tsakonas,



Tongren et Riley, 2003; Clark et Cowden, 2003; Li *et al.*, 2003; Jaramillo *et al.*, 2004; Stevenson et Riley, 2004; Clark *et al.*, 2006; Hafalla, Cockburn et Zavala, 2006). Ces molécules proviennent vraisemblablement de l'activation de l'immunité innée par les PAMP (de l'anglais « pathogen-associated molecular pattern ») exprimés par le *Plasmodium* (Creagh et O'Neill, 2006; Gazzinelli et Denkers, 2006). En se fixant sur les récepteurs de type TLR (pour « Toll-like receptors »), NLR (pour « NOD-like receptors ») et RLR (pour « RIG-like receptors »), les PAMP induisent la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée dont les monocytes et les MP (Creagh et O'Neill, 2006). Le *Plasmodium* exprime différents PAMP dont le Glycosylphosphatidylinositol (GPI) et l'HZ (Gazzinelli et Denkers, 2006). Le GPI est un glycolipide exprimé à la surface du *Plasmodium* et reconnu par les complexes TLR2/TLR1, TLR2/TLR6 et le TLR4 (Krishnegowda *et al.*, 2005). De son côté, l'HZ présentée précédemment est reconnue par le TLR9 même si ceci ne semble pas être accepté par l'ensemble de la communauté scientifique (Coban *et al.*, 2007; Parroche *et al.*, 2007) et le NLRP3 (Shio *et al.*, 2009). Du fait de leur capacité à activer la voie des TLR et des NLR et à induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires, le GPI et l'HZ sont suspectés d'être impliqués dans le développement de l'inflammation responsable de la pathologie associée aux infections par *Plasmodium* (Sherry *et al.*, 1995; Jaramillo *et al.*, 2004; Gazzinelli et Denkers, 2006; Jaramillo *et al.*, 2009). En plus de l'activation de la réponse immunitaire innée par les PAMP, l'infection par *Plasmodium* induit la lyse intravasculaire de GR, ce qui va contribuer au développement de l'inflammation (Francis, Sullivan et Goldberg, 1997). Une fois les GR lysés, l'Hb va être oxydée en metHb et va libérer l'HE (Wagener *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2008). De part son pouvoir pro-oxydant (Wagener *et al.*, 2003; Kumar et Bandyopadhyay, 2005) et sa fixation sur le TLR4 (Figueiredo *et al.*, 2007), l'HE monomérique va induire la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires ce qui pourrait impliquer cette molécule dans le développement de la pathologie associée aux infections par *Plasmodium* (voir par. 1.3.2.3) (Graca-Souza *et al.*, 2002). De manière intéressante, les souches de *Plasmodium* provoquant la MC causent des infections associées à des concentrations plus importantes d'HE dans le sérum (Ferreira *et al.*, 2008). De plus, les souches de souris capables de produire une forte activation de la hème oxygénase 1 (HO-1) (enzyme responsable de la dégradation de l'HE) ne succombent pas à la MC alors que les souris dépourvues de cette enzyme sont plus sensibles (Ferreira *et al.*,

2008). Ces études confirment l'importance de l'HE dans le développement de la pathologie associée à la malaria (Ferreira *et al.*, 2008). De plus, elles suggèrent que l'importance de l'HE dans le développement de la pathologie lors des infections par *Plasmodium* est modulée par des facteurs propres au parasite (dans le cas présenté ici, une capacité accrue du parasite à provoquer la libération d'HE) mais aussi par des facteurs propres à l'hôte lui-même (dans le cas présenté ici, une capacité accrue de l'hôte à induire l'activation de la HO-1).

#### 1.1.6.2. Malaria cérébrale

La MC entraîne des pertes de conscience pouvant conduire au coma et causer la mort dans 25 à 50% des cas (Newton, Hien et White, 2000). La cause de cette pathologie n'est pas encore claire mais deux hypothèses sont envisagées. Premièrement, la MC serait due à l'obstruction des capillaires du cerveau par une accumulation de GR parasités (hypothèse « mécanique ») (Li, Seixas et Langhorne, 2001; Ferreira *et al.*, 2008). Les GR parasités expriment à leur surface des molécules de cyto-adhérence d'origine parasitaire comme la PfEMP1 (Newton, Hien et White, 2000). Ces protéines peuvent interagir avec certains récepteurs des cellules endothéliales comme le ICAM-1 (de l'anglais « intra-cellular adhesion molecule 1 ») ou la E-sélectine et aussi provoquer l'adhésion de GR sains aux GR parasités (phénomène de « rosetting ») (Carlson *et al.*, 1990; Hearn *et al.*, 2000; Newton, Hien et White, 2000). Ces phénomènes causeraient l'obstruction des capillaires et l'hypoxie du cerveau. Deuxièmement, la présence de fortes concentrations locales de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , lymphotoxine- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-1) lors de l'infection entraînerait une production excessive de NO qui causerait les dysfonctions cérébrales associées à la MC (hypothèse « inflammatoire ») (Grau *et al.*, 1987; Kwiatkowski *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1995; Newton, Hien et White, 2000; Li, Seixas et Langhorne, 2001; Engwerda *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008). Ces cytokines sont vraisemblablement produites par les MP activés et les cellules T CD8<sup>+</sup> qui s'accumulent au niveau du cerveau (Pais et Chatterjee, 2005). D'autres études ont aussi démontré que ces cytokines pouvaient augmenter l'expression d'ICAM-1 au niveau des capillaires du cerveau favorisant ainsi l'adhérence des GR parasités, ce qui permettrait de réconcilier les hypothèses « mécanique » et « inflammatoire » (Grau *et al.*, 1987; Miller, Good et Milon, 1994). Les cellules CD8<sup>+</sup>

semblent jouer un rôle prépondérant dans la MC. Ceci est appuyé par des études montrant que, lors des infections, le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> en circulation et au niveau du cerveau augmente de manière significative (Boubou *et al.*, 1999; Pais et Chatterjee, 2005). De plus, les souris ne possédant pas cette population cellulaire (déplétion avec un anticorps anti-CD8 et souris CD8 knock-out) ne développent pas la MC (Yanez *et al.*, 1996; Boubou *et al.*, 1999). Finalement, l'expression du récepteur CCR5 (de l'anglais « C-C chemokine receptor type 5 ») et de la perforine par les cellules CD8<sup>+</sup> est nécessaire au développement de la pathologie (Nitcheu *et al.*, 2003).

### 1.1.6.3. Anémie sévère

Les infections par *Plasmodium* sont associées au développement d'une anémie pouvant conduire à la mort (Woodruff, Ansdell et Pettitt, 1979; Abdalla *et al.*, 1980). La lyse des GR parasités a longtemps été reconnue comme le seul mécanisme responsable du développement de l'anémie. Cependant, des cas d'anémies sévères ont été observés chez des patients ayant des parasitemies faibles (Wickramasinghe et Abdalla, 2000) et certaines études rapportent que l'hématocrite peut continuer à diminuer même après l'élimination du parasite (Phillips *et al.*, 1986). Ainsi, il semblerait que des mécanismes additionnels dont l'inhibition de l'érythropoïèse et la phagocytose de GR non parasités soient impliqués dans le développement et le maintien de l'anémie pendant la malaria.

#### Inhibition de l'érythropoïèse:

Il a été démontré que, pendant les infections par *Plasmodium*, l'érythropoïèse (dont le rôle est de produire de nouveaux GR afin de compenser les pertes) semble dysfonctionnelle (Chang et Stevenson, 2004). Il a été proposé que les cytokines pro-inflammatoires dont le MIF, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IFN- $\gamma$  produites pendant l'infection inhiberaient le développement des précurseurs érythropoïétiques (Means et Krantz, 1992; Li, Seixas et Langhorne, 2001; Chang et Stevenson, 2004). Le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et IFN- $\gamma$  semblent jouer un rôle mineur comparativement au MIF (Yap et Stevenson, 1994; Chang et Stevenson, 2004). Bien que toutes ces cytokines soient capables de réduire la production d'érythropoïétine (EPO) (hormone essentielle à l'érythropoïèse) *in vitro*, le niveau de cette hormone est élevé durant

les infections par *Plasmodium*. Par conséquent, la suppression de l'érythropoïèse lors des infections par *Plasmodium* ne semble pas due à l'inhibition de cette hormone par la production accrue des cytokines pro-inflammatoires citées précédemment. Des études additionnelles ont démontré que l'inhibition de l'érythropoïèse lors des infections par *Plasmodium* est due à l'incapacité des précurseurs érythropoïétiques à répondre correctement à l'EPO (Chang et Stevenson, 2004). Il serait intéressant d'évaluer l'implication des cytokines pro-inflammatoires dans ce phénomène.

En parallèle, des études utilisant un modèle murin (Mohan et Stevenson, 1998; Sam et Stevenson, 1999) et plusieurs études épidémiologiques (Luty *et al.*, 2000; Perkins, Weinberg et Kremsner, 2000; Malaguarnera *et al.*, 2002; Malaguarnera *et al.*, 2002; Chaisavaneeyakorn *et al.*, 2003; Chaiyaroj *et al.*, 2004) ont démontré que la sévérité de l'anémie malarique était en corrélation inverse avec la concentration d'IL-12 sérique. L'IL-12 étant capable de stimuler l'érythropoïèse *in vitro* (Dybedal, Larsen et Jacobsen, 1995; Kang, Kim et Kim, 2005), l'addition d'IL-12 recombinante a été évaluée afin de restaurer l'érythropoïèse et de favoriser la résolution des infections par *Plasmodium*. Plusieurs études menées avec différents modèles murins et simiens ont démontré que l'ajout d'IL-12 recombinante permettait une stimulation de l'érythropoïèse et une restauration de l'hématocrite (Mohan et Stevenson, 1998; Mohan, Sam et Stevenson, 1999; Normaznah *et al.*, 1999). Ainsi, il semblerait que le déficit en IL-12 lors des infections par *Plasmodium* contribue de manière significative au développement de l'anémie en inhibant l'érythropoïèse.

#### Destruction des GR non parasités :

Il a été observé que la malaria induit une destruction importante et inattendue de GR non parasités. Ces derniers voient leur espérance de vie passer de 120 jours à 80 jours pendant les infections (Berlin, 1964; Woodruff, Ansdell et Pettitt, 1979; Bratosin *et al.*, 1998). Les radicaux libres générés lors de l'infection entraîneraient la détérioration de la membrane des GR, ce qui induirait différents mécanismes de destruction liés au vieillissement prématuré de ces cellules (Jakobsen *et al.*, 1995; Lutz, Pfister et Hornig, 1996; Bratosin *et al.*, 1998; Waitumbi *et al.*, 2000). De plus, certaines études ont démontré que les patients atteints de la thalassémie et de l'anémie falciforme, deux maladies héréditaires

affectant la stabilité de l'Hb (Becker *et al.*, 2004; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009), présentent un vieillissement prématuré de leurs GR. Ce vieillissement prématuré semble dû à l'insertion d'HE dans la membrane des GR suite à la précipitation de l'Hb (voir art. 1.4.4) (Hebbel, 1991; Shalev *et al.*, 1995; Browne *et al.*, 1997; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). Le fait que les infections par *Plasmodium* soient elles aussi associées à la libération d'HE dans la circulation sanguine suggère que cette molécule pourrait promouvoir la destruction de GR non parasités pendant la malaria (voir art. 1.4.4) (Ferreira *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2009).

Toutes ces études suggèrent que l'anémie et la MC associées à la malaria sont principalement dues à la production excessive de cytokines pro-inflammatoires et à la présence d'hème libre dans le sérum plutôt qu'à des lésions causées directement par le parasite.

#### 1.1.7. État d'immunosuppression associé à la malaria

Les protozoaires, comme *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Entamoeba* et *Leishmania* sont des pathogènes reconnus pour leur capacité à interférer avec le développement de la réponse immunitaire antiparasite. Ainsi, les protozoaires emploient de nombreux mécanismes immunosuppresseurs (pour une liste exhaustive consulter (Zambrano-Villa *et al.*, 2002)) leur permettant de favoriser leur multiplication et/ou de prolonger leur survie au sein de l'hôte.

En ce qui concerne le *Plasmodium*, nous avons déjà mentionné qu'il possède des moyens d'évasion propres à sa physiologie dont le polymorphisme antigénique et la variation antigénique (voir par. 1.1.4.3). En plus, le *Plasmodium* est aussi capable d'induire un état d'immunosuppression généralisé en interférant avec l'induction d'une réponse immunitaire efficace contre lui-même et divers pathogènes. Ainsi, les infections par *Plasmodium* sont associées à une sensibilité accrue aux infections par certaines bactéries dont *Salmonella typhi* (Bennett et Hook, 1959; Greenwood, 1974; Williamson et Greenwood, 1978; Mabey, Brown et Greenwood, 1987) et par certains virus dont les virus *Herpes zoster* (Cook, 1985), *VIH* (Hoffman *et al.*, 1999), *Epstein-Barr* (Whittle *et al.*, 1984) et *Herpes simplex* (Scott, 1944). De plus, il a été démontré que l'efficacité de certains vaccins était réduite chez les personnes

atteintes de la malaria (Williamson et Greenwood, 1978). Ces études confirment l'état de suppression immunitaire généralisé associé aux infections par *Plasmodium*.

#### 1.1.7.1. Mécanismes immunosuppresseurs induits pendant la malaria

L'immunosuppression pendant la malaria est un phénomène complexe qui semble avoir de multiples causes et qui peut persister plusieurs semaines après l'élimination du parasite (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003).

Premièrement, les protozoaires sont capables de moduler l'apoptose des cellules immunitaires afin de permettre leur survie (Navarre et Zychlinsky, 2000; Luder, Gross et Lopes, 2001; James et Green, 2004; Luder et Gross, 2005; Dkhil, 2009). Dans ce contexte, les infections par *Plasmodium* induisent l'apoptose de cellules essentielles à l'élimination du parasite dont les cellules T, les cellules B et de manière plus prononcée les MP (voir art. 1.4.5) (Balde *et al.*, 2000; Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000; Piguët *et al.*, 2001; Kemp *et al.*, 2002; Riccio *et al.*, 2003; Wichmann *et al.*, 2007). Au pic d'infection, une rate de souris infectée par le *PccAS* peut contenir jusqu'à 40 millions de MP apoptotiques (Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). Le nombre de cellules apoptotiques augmente au fur et à mesure que le parasite colonise les GR et atteint un maximum 2 jours après le pic de parasitémie (Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). Le mécanisme conduisant à l'apoptose massive de MP reste pour le moment inconnu. Bien que l'élimination de ces cellules importantes dans l'immunité contre le *Plasmodium* puisse représenter un mécanisme immunosuppresseur employé par le parasite, il est aussi envisageable que ce soit un processus normal associé à la contraction de la réponse immunitaire. En effet, l'apoptose de cellules immunitaires est un phénomène pouvant intervenir lors de la réponse contre un pathogène. On peut notamment penser à la phase de contraction de la réponse immunitaire où de nombreuses cellules T sont éliminées par apoptose ou encore à la mort des neutrophiles suite à leur activation (Lenardo *et al.*, 1999; Simon, 2003; McKinstry, Strutt et Swain, 2010).

Deuxièmement, il a été démontré que le développement du parasite dans le sang affecte les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Warren et Weidanz, 1976; Correa, Narayanan et Miller, 1980; Scorza *et al.*, 1999; Urban *et al.*, 1999; Luyendyk *et al.*, 2002;

Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003). Ainsi, les MP et les cellules dendritiques (CD) provenant de souris infectées par le *Plasmodium* sont incapables d'induire une sécrétion d'IL-2 et une prolifération optimale des cellules T CD4<sup>+</sup> (Scorza *et al.*, 1999; Luyendyk *et al.*, 2002). Ce phénomène semble dû à la fois à l'incapacité des CPA à présenter correctement l'antigène aux cellules T et à la sécrétion de facteurs solubles suppressifs (Loose, Cook et Di Luzio, 1972; Warren et Weidanz, 1976; Kim, Weinbaum et Asofsky, 1978; Correa, Narayanan et Miller, 1980; Loose, 1984; Brown et Kreier, 1986; Mahajan *et al.*, 1986; Scorza *et al.*, 1999; Urban *et al.*, 1999; Luyendyk *et al.*, 2002; Deshpande et Shastry, 2004). Dans le même ordre d'idée, les CD provenant de souris infectées par le *Plasmodium* produisent beaucoup d'IL-10 dont la sécrétion inhibe l'activation et la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003; Biswas *et al.*, 2007). En plus de rendre les CPA incapables de stimuler correctement les cellules T, les infections par *Plasmodium* entraînent aussi une inhibition des leurs fonctions effectrices dont la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , NO et IL-12) et la capacité à neutraliser les bactéries, les moisissures et les cellules tumorales (Schwarzer *et al.*, 1992; Taramelli *et al.*, 1995; Schwarzer et Arese, 1996; Xu *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2006; Wykes *et al.*, 2007; Wykes et Good, 2008).

Troisièmement, de nombreuses études rapportent que la malaria est associée à une faible capacité proliférative des cellules T (Luyendyk *et al.*, 2002; Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003; Urban et Roberts, 2003; Cambos *et al.*, 2008). Dans ce contexte, les cellules T provenant de souris infectées par *Plasmodium* produisent très peu d'IL-2 et ne prolifèrent quasiment pas en réponse à diverses stimulations polyclonales (Cambos *et al.*, 2008) (résultats non publiés). Il reste à déterminer si cette capacité limitée à répondre à la stimulation est liée à une inhibition des cellules T ou à un épuisement suite à leur activation excessive/répétée pendant les infections par *Plasmodium* (Mittendorf et Sharma, 2010; Yi, Cox et Zajac, 2010). Comme décrit dans le paragraphe précédent, les MP de souris infectées par le *Plasmodium* produisent des facteurs solubles capables d'inhiber l'activation des cellules T et pourraient être impliqués dans la suppression de ces cellules. Plus récemment, une étude a démontré que les infections par *Plasmodium* provoquaient un recrutement et une activation de cellules TregN (voir par. 1.2.2.3) (Hisaeda *et al.*, 2004). Il semblerait que l'activation de ces cellules soit responsable de la faible capacité des cellules T à répondre à la

stimulation. Dans ce modèle d'infection utilisant le PyL, l'élimination des cellules TregN permet de réduire fortement la suppression affectant les cellules T et permet aux souris de résoudre l'infection normalement létale (Hisaeda *et al.*, 2004). Ces résultats prometteurs doivent être évalués avec d'autres modèles expérimentaux afin de déterminer si ce mécanisme suppresseur est employé par différentes souches de *Plasmodium*, ce qui laisserait entrevoir la possibilité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de soigner la malaria.

De nombreux autres mécanismes immunosuppresseurs ont été décrits et pourraient affecter la réponse contre le *Plasmodium*. Ainsi, il a été démontré que, pendant les infections, les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes du *Plasmodium* étaient éliminées rapidement (Hirunpetcharat et Good, 1998). De plus, le parasite induit aussi une activation polyclonale des cellules B conduisant à la production d'anticorps de spécificités diverses dont certains spécifiques du soi (Adu *et al.*, 1982; Donati *et al.*, 2004). Dans ce contexte, Donati *et al.* ont démontré que la région CIDR1- $\alpha$  de la protéine parasitaire PfEMP1 exprimée à la surface des GR parasités agirait comme un activateur polyclonal des cellules B (Donati *et al.*, 2004).

Les différents mécanismes immunosuppresseurs décrits ci-dessus pourraient expliquer, au moins partiellement, la sensibilité accrue des personnes atteintes de la malaria aux infections par divers pathogènes ainsi que leur difficulté à éliminer le *Plasmodium* (infections persistantes) et à développer une protection complète contre ce parasite (infections répétées tout au long de la vie).

#### **1.1.7.2. Agents responsables de l'induction de l'immunosuppression**

De nombreuses études rapportent que l'intensité de l'immunosuppression est directement liée à la parasitémie (Greenwood, Playfair et Torrigiani, 1971; Orjih et Nussenzweig, 1979; Brasseur *et al.*, 1983; Ahvazi, Jacobs et Stevenson, 1995; Scorza *et al.*, 1999; Helmbj, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000; Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003). Ceci suggère que l'immunosuppression est intimement liée au développement du parasite dans le sang. Dans ce contexte, il a été suggéré que l'acquisition d'HZ par les phagocytes serait à l'origine de l'état d'immunosuppression induit par la malaria (Morakote



et Justus, 1988; Schwarzer *et al.*, 1992; Taramelli *et al.*, 1995; Schwarzer et Arese, 1996; Schwarzer *et al.*, 1998; Scorza *et al.*, 1999; Deshpande et Shastry, 2004; Keller *et al.*, 2006; Millington *et al.*, 2006). De manière intéressante, le fait que l’HZ puisse persister pendant plusieurs mois dans les phagocytes et les tissus (Schwarzer *et al.*, 1998; Levesque, Sullivan et Meshnick, 1999; Schwarzer *et al.*, 1999) et le fait que l’état d’immunosuppression persiste lui aussi plusieurs mois/semaines après l’élimination du parasite tendent à supporter l’implication du pigment malarique dans la suppression immunitaire (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003). Bien que l’HZ semble responsable de certains mécanismes immunosuppresseurs, il est fort probable que d’autres facteurs soient aussi impliqués. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires ou encore l’HE, qui sont libérées en quantités importantes lors des infections par *Plasmodium*, pourraient affecter certaines cellules immunitaires et contribuer à l’immunosuppression.

Même si l’induction de l’immunosuppression semble directement liée à la phase érythrocytaire du cycle de développement du *Plasmodium*, cette suppression pourrait affecter l’immunité contre les stades d’infection intra-hépatiques. Étant donné que la suppression immunitaire se manifeste rapidement après la phase pré-érythrocytaire, il est envisageable qu’elle affecte la différenciation des cellules mémoires spécifiques aux parasites intra-hépatiques. En effet, la non sécrétion de certaines cytokines (en particulier l’IL-7 et l’IL-15) essentielles au développement, à la différenciation et à la survie des cellules mémoires pourrait conduire à la dégénérescence de ces dernières (Sprent et Surh, 2002; Schluns et Lefrançois, 2003). Ceci permettrait encore une fois d’expliquer pourquoi l’acquisition d’une protection contre la réinfection est longue et incomplète. Cette hypothèse est supportée par le fait que la protection efficace contre la réinfection induite par les sporozoites irradiés (parasites incapables de poursuivre leur cycle de développement au-delà de la phase pré-érythrocytaire) est complètement annihilée si l’inoculation de ces derniers est suivie rapidement par une infections par des sporozoites sauvages capables de réaliser la phase érythrocytaire (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003).

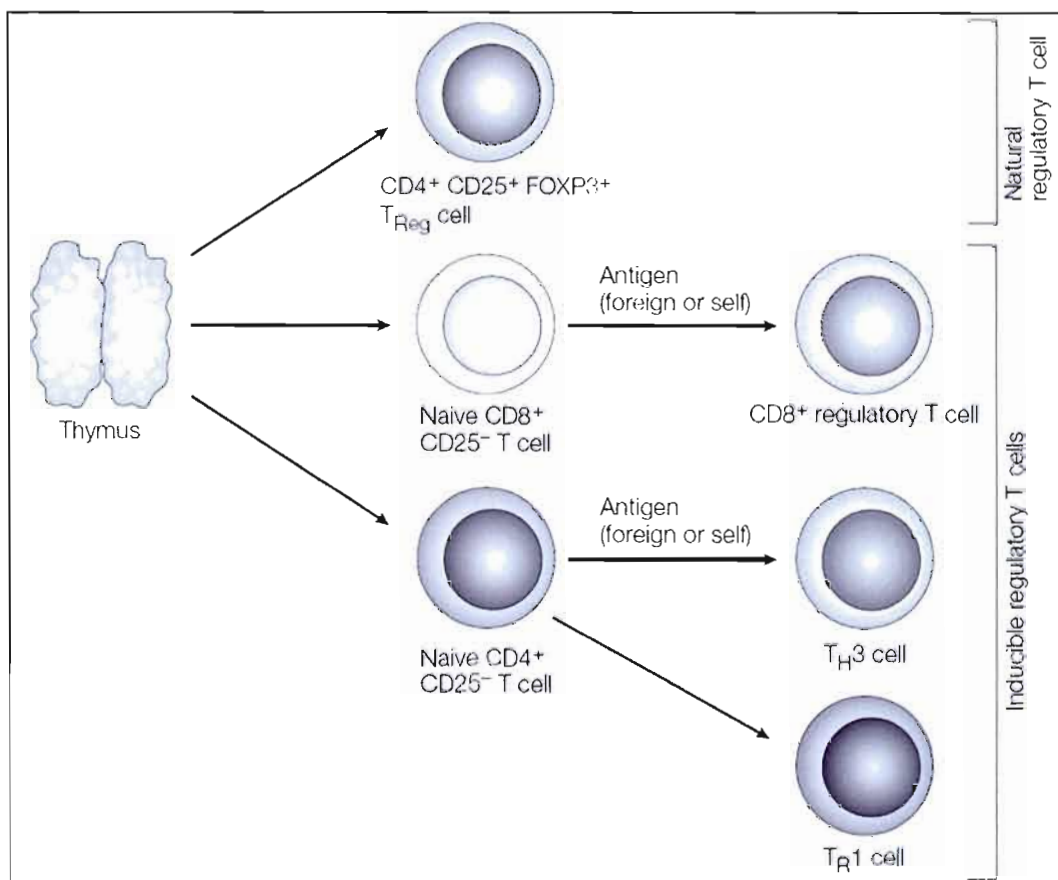
## 1.2. Impact des cellules T régulatrices naturelles pendant les infections par *Plasmodium*

Comme décrit précédemment, les infections par *Plasmodium* chez l'homme sont caractérisées par la persistance du parasite pendant plusieurs mois en absence de traitement. En effet, malgré la forte réponse inflammatoire responsable de diverses pathologies associées à la malaria, l'élimination complète du parasite reste difficile. De plus, l'acquisition d'une immunité contre le *Plasmodium* demande plusieurs années d'exposition et permet un meilleur contrôle du parasite sans toutefois empêcher la réinfection. Il a été proposé que la persistance du parasite et l'acquisition d'une immunité incomplète (« non-stérilisante ») même après plusieurs années d'infections répétées soient dues à l'immunosuppression associée à la malaria (Hansen et Schofield, 2010).

Bien que de nombreux mécanismes puissent intervenir dans l'immunosuppression associée à la malaria (voir art. 1.1.6), des études démontrant que les infections par *Plasmodium* provoquent une inhibition de la prolifération des cellules T (Plebanski *et al.*, 1999) ainsi que la sécrétion accrue de cytokines suppressives (IL-10 (Kossodo *et al.*, 1997) et TGF- $\beta$  (pour « transforming growth factor beta ») (Omer et Riley, 1998; Omer, de Souza et Riley, 2003)) suggèrent que les cellules T régulatrices (Treg) (Fig. 1.5) pourraient être impliquées dans la suppression du système immunitaire.

Bien que longtemps controversée, l'existence des cellules Treg est maintenant largement acceptée chez l'homme, la souris et de manière générale chez les mammifères (Levings, Sangregorio et Roncarolo, 2001). Les cellules Treg ont comme principale rôle de limiter les réactions immunitaires excessives ou inappropriées pouvant conduire à l'endommagement ou à la destruction des tissus. En particulier, ces cellules jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de l'auto-immunité et des inflammations chroniques (Sakaguchi *et al.*, 2008; Vignali, Collison et Workman, 2008). Plus récemment, il a été proposé que la fonction suppressive de ces cellules pourrait être exploitée par les pathogènes afin de leur permettre d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de favoriser leur survie (Mills, 2004; Belkaid et Rouse, 2005). Les cellules Treg agissent principalement sur les

cellules T effectrices en restreignant leur prolifération et leur sécrétion de cytokines via divers mécanismes dont le contact cellulaire et la sécrétion de cytokines suppressives (voir par. 1.2.1.4) (Vignali, Collison et Workman, 2008).



**Figure 1.5: Les principales populations de cellules Treg naturelles et inducibles**

Plusieurs types de cellules T régulatrices sont impliqués dans le contrôle des réactions immunitaires. Les cellules T régulatrices naturelles ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) sont produites dans le thymus et sont présentes de manière naturelle (en absence d'infection) dans l'organisme. Les cellules T régulatrices inducibles proviennent de la différenciation de cellules T effectrices conventionnelles ( $CD4^+CD25^-$  ou  $CD8^+CD25^-$ ) en périphérie. Parmi les cellules T régulatrices inducibles on peut citer les cellules  $T_H3$ ,  $T_{R1}$  et les cellules T régulatrices  $CD8^+$ .

Source : (Mills, 2004)

A l'heure actuelle, deux grandes catégories de cellules Treg ont été identifiées et toutes deux appartiennent à la population des cellules T CD4<sup>+</sup> (Roncarolo *et al.*, 2001; Roncarolo, Gregori et Levings, 2003). La première catégorie correspond aux cellules Treg naturelles (TregN) qui, comme leur nom l'indique, sont présentes de manière naturelle dans l'organisme (i.e. en absence d'infection) (Fig. 1.5). La seconde catégorie est composée des cellules Treg inductibles (TregI) dans lesquelles se trouvent les cellules Treg de type Th3 (pour « T helper 3 »)(Weiner, 2001; Shevach, 2006) et Tr1 (pour « T regulatory cells 1 ») (Roncarolo *et al.*, 2001; Shevach, 2006) (Fig. 1.5). Ces cellules dérivent de cellules T CD4<sup>+</sup> périphériques activées par des CPA immatures ou dans des conditions de stimulation faiblement immunogéniques. Plus récemment, de nouvelles catégories de cellules Treg ont été décrites dans les populations des cellules T CD8<sup>+</sup>, des cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> et des cellules T  $\gamma/\delta$ . Pour le moment, aucun indice n'indique que ces cellules Treg jouent un rôle crucial *in vivo* (Sakaguchi *et al.*, 2008). Dans le reste de ce document, nous nous intéresserons principalement aux cellules TregN.

### **1.2.1. Les cellules T régulatrices naturelles**

#### **1.2.1.1. Origine des cellules T régulatrices naturelles**

Chez l'homme et la souris, les cellules TregN représentent 5 à 10% des cellules T CD4<sup>+</sup> en circulation et sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD25 et FOXP3 (pour « forkhead box P3 ») sur lesquels nous reviendrons plus en détail dans le paragraphe 1.2.1.2. Ces cellules sont produites en continu par le thymus à partir du 4<sup>ème</sup> jour post-natal et leur nombre final est atteint trois semaines après la naissance (Sakaguchi, 2004; Fontenot *et al.*, 2005). L'implication du thymus dans la production des cellules TregN provient d'observations réalisées par deux équipes. Tout d'abord, il a été démontré que l'ablation du thymus au jour trois post-natal conduisait à l'apparition de réactions auto-immunes affectant notamment les ovaires (Nishizuka et Sakakura, 1969). Ensuite, il a été rapporté que l'ablation du thymus en combinaison à plusieurs expositions à des doses non létales de rayons X provoquaient l'apparition d'auto-anticorps et de réactions auto-immunes affectant la thyroïde chez des rats adultes (Penhale *et al.*, 1973). Étant donné que le transfert de cellules T, plus

particulièrement de la population  $CD4^+$ , permettait d'empêcher l'apparition de pathologies, ces deux équipes ont conclu que l'apparition des réactions auto-immunes était due à la disparition d'une population de cellules T suppressives (nommées par la suite cellules TregN) suite à l'ablation du thymus (Penhale *et al.*, 1976; Sakaguchi, Takahashi et Nishizuka, 1982). L'ablation du thymus au jour sept post-natal ne causant pas de dysfonction des ovaires, il a été déterminé que la production des cellules TregN commence autour du jour quatre post-natal (Nishizuka et Sakakura, 1969).

De manière très intéressante, des études réalisées *in vivo* chez la souris et *in vitro* chez l'homme ont montré qu'il était possible de générer des cellules semblables aux TregN exprimant les marqueurs CD25 et FOXP3 à partir de cellules T  $CD4^+$  périphériques conventionnelles (Akbar *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Sakaguchi, 2003; Apostolou et von Boehmer, 2004; Kretschmer *et al.*, 2005; Taams et Akbar, 2005). Il semblerait que leur différenciation en cellules TregN nécessite la présence du TGF- $\beta$  (Chen *et al.*, 2003; Kretschmer *et al.*, 2005) et soit facilitée par l'IL-2 (Laurence *et al.*, 2007) et l'acide rétinoïque (Benson *et al.*, 2007; Coombes *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). L'acide rétinoïque est normalement produit par une sous population de CD située à un niveau de l'intestin et pourrait, via sa capacité à induire la différenciation de cellules TregN, être responsable du phénomène de tolérance orale associé aux muqueuses intestinales. Ainsi, les cellules TregN pourraient être générées à la fois au niveau du thymus et de la périphérie. Cependant, la stabilité des cellules TregN générées en périphérie et leur proportion au sein du pool total de cellules TregN restent à être déterminer afin d'évaluer leur importance *in vivo*. La possibilité que les cellules T  $CD4^+$  conventionnelles employées dans ces expériences de différenciation soient en réalité des cellules TregN originaires du thymus ayant perdu leur phénotype de cellules Treg ou n'ayant pas terminé leur différenciation demeure envisageable.

#### 1.2.1.2. Phénotype des cellules T régulatrices naturelles

Au cours des dernières années, les cellules TregN ont été largement étudiées et caractérisées. Ces cellules expriment certains TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 et 8) (Sakaguchi, 2003) et d'autres protéines à des niveaux d'expression variables :  $CD45^{faible}$ ,  $CD44^{fort}$ ,  $CD5^{fort}$ ,  $CD54$  (Intercellular Adhesion Molecule 1) $^{fort}$ ,  $CD11a/CD18$  (LFA-1) $^{fort}$  et

partiellement CD62L<sup>faible</sup> (Sakaguchi, 2003). Leur phénotype ressemble à celui de cellules fortement différenciées ou de cellules T mémoires. Ainsi, contrairement aux cellules T naïves, les cellules TregN expriment de manière constitutive la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25), le CTLA-4 (pour « cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 »)(ou CD152), le GITR (pour « glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ») et le CD28 (Holm, Nielsen et Claesson, 2004). Cependant, ces marqueurs phénotypiques ne sont pas spécifiques aux cellules TregN. En effet, les cellules T CD4<sup>+</sup> activées expriment elles-aussi ces protéines de surface. Alors qu'en absence d'infection, la population des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> est quasiment exclusivement composée de cellules TregN, lors d'une réponse immunitaire des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices activées s'ajoutent à cette population. L'absence de marqueur spécifique permettant d'identifier clairement les cellules TregN a longtemps freiné et biaisé leur étude.

En 2003, un facteur de transcription essentiel au développement, à la survie et à l'activité suppressive des cellules TregN a été découvert. Ce facteur de transcription a été nommé scurfine (aussi appelé FOXP3) et le gène le codant nommé *foxp3* (Hori, Nomura et Sakaguchi, 2003). L'expression du gène *foxp3* semble essentiellement restreinte aux cellules TregN en faisant un marqueur spécifique de cette population cellulaire. De manière intéressante, une population de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> exprimant le gène *foxp3* (correspondant à 40% des cellules FOXP3<sup>+</sup> de la rate chez la souris) et ayant des capacités suppressives similaires aux TregN (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) a été décrite plus récemment (Fontenot *et al.*, 2005). Ainsi, il semblerait que l'expression du gène *foxp3* ne soit pas limitée aux cellules TregN mais qu'elle puisse être présente chez d'autres cellules Treg. Il a été démontré que certaines populations de cellules Th3 expriment le gène *foxp3* (Sakaguchi *et al.*, 2008). En revanche, à l'heure actuelle, aucune étude ne rapporte l'expression de ce gène dans la population des cellules Tr1 (Sakaguchi *et al.*, 2008). Il est aussi envisageable que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> soient des cellules TregN ayant perdu l'expression du CD25. Une étude a rapporté que, lors de leur expansion homéostatique, les cellules TregN réduisent leur expression de CD25 (Gavin *et al.*, 2002; Fontenot *et al.*, 2005). De même, il a été démontré que les cellules TregN diminuaient fortement l'expression du marqueur CD25 en absence de son substrat l'IL-2 (Fontenot *et al.*, 2005). Dans un tout autre contexte, il a été rapporté que suite à leur

activation, les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> conventionnelles expriment le gène *foxp3* et acquièrent un phénotype suppressif. Ce phénomène est transitoire et l'expression du gène *foxp3* est réduite comparativement à celle observée chez les TregN. Six jours après l'activation, l'expression de FOXP3 et l'activité suppressive de ces cellules disparaissent pour laisser place aux fonctions effectrices caractéristiques des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Pillai *et al.*, 2007). Pour le moment, ces résultats se limitent à l'homme et n'ont pas été observés chez la souris.

### 1.2.1.3. Développement et survie des cellules T régulatrices naturelles

Comme décrit précédemment, le développement des cellules TregN se passe principalement au niveau du thymus. Les cellules TregN semblent provenir de thymocytes possédant des TCR (pour « T cell receptor ») ayant une très forte affinité pour les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) associés aux peptides. Les signaux et les mécanismes conduisant à la génération des cellules TregN restent encore mal connus (Sakaguchi *et al.*, 2008). Cependant, l'expression du gène *foxp3* et la fixation de l'IL-2 sur son récepteur composé du CD25 semblent déterminants dans le développement, la survie et l'activité suppressive des cellules TregN.

L'importance du gène *foxp3* est soulignée par les diverses maladies auto-immunes associées à son absence ou à sa dysfonction. En effet, les souris scurfy déficientes en scurfine (produit de l'expression du gène *foxp3*) et les individus possédant une mutation affectant le gène *foxp3* développent diverses réactions auto-immunes sévères rappelant la pathologie des souris ayant subi une ablation du thymus au jour trois post-natal (Bennett *et al.*, 2001; Brunkow *et al.*, 2001; Wildin *et al.*, 2001; Vignali, Collison et Workman, 2008). Le fait que les souris scurfy présentent un nombre anormalement faible de cellules TregN et que le transfert de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de souris saines permette d'empêcher l'apparition de désordres auto-immuns suggèrent que l'absence d'un gène *foxp3* fonctionnel affecte le développement et/ou l'activité suppressive des cellules TregN (Fontenot, Gavin et Rudensky, 2003). De manière intéressante, l'expression ectopique du gène *foxp3* chez des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> provoque leur conversion en cellules Treg ayant un phénotype et une activité suppressive semblables aux cellules TregN générées par le thymus (Hori, Nomura et

Sakaguchi, 2003; Yagi *et al.*, 2004; Vignali, Collison et Workman, 2008). L'expression de la scurfine chez les cellules  $CD4^+CD25^-$  inhibe leur prolifération et leur production d'IL-2, d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  suite à la stimulation par le TCR (Schubert *et al.*, 2001; Bettelli, Dastrange et Oukka, 2005) tout en induisant l'expression des marqueurs CD25, GITR et du CTLA-4 (Yagi *et al.*, 2004). L'action de la scurfine semble provenir de sa capacité à interagir avec divers facteurs de transcription dont NFAT (pour « nuclear factor of activated T-cells »), AML1/Runx1 (pour « Runt-related transcription factor 1 »), HAT/HDAC (pour « histone acetyltransferase/histone deacetylases ») et NF $\kappa$ B (pour « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») et à moduler leur fonction suite à leur activation par la stimulation du TCR (Sakaguchi *et al.*, 2008). Ces expériences confirment l'importance du gène *foxp3* dans le développement des cellules TregN.

L'IL-2 semble aussi cruciale au développement, à la survie et à l'activité suppressive des cellules TregN. Cette cytokine est reconnue par un récepteur de faible affinité composé d'une chaîne  $\gamma$  commune à différents récepteurs de cytokines ( $\gamma_c$  ou CD132) et d'une autre sous-unité connue sous le nom de chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2 (IL-2R $\beta$  ou CD122). L'ajout de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (IL-2R $\alpha$  ou CD25) à ce complexe permet de former le récepteur de haute affinité à l'IL-2 (Waldmann, 2006). L'IL-2 est connue pour son implication dans la prolifération et la différenciation des cellules T (Sakaguchi *et al.*, 2008). Pour cette raison, il a été très surprenant de découvrir que les souris déficientes pour cette cytokine présentent des cellules T effectrices complètement fonctionnelles. En revanche, cette déficience est accompagnée de multiples pathologies auto-immunes associées au développement anarchique des cellules T et à une forte inflammation (Malek et Bayer, 2004). Les souris déficientes en CD25 ou CD122 succombent d'une pathologie similaire à celle décrite à l'instant rappelant fortement le syndrome IPEX (pour « immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome ») associé à la mutation du gène *foxp3* chez l'homme. Ces déficiences sont associées à un nombre réduit de cellules TregN et le transfert de cellules  $CD4^+CD25^+$  permet d'empêcher l'apparition des manifestations auto-immunitaires confirmant le rôle de l'IL-2 dans le développement et l'activité des cellules TregN (Malek et Bayer, 2004; Antony *et al.*, 2006). L'IL-2 semble agir sur les cellules TregN en assurant le maintien de l'expression du gène *foxp3* ainsi que du CD25 et en permettant



d'accroître leur activité suppressive (Fontenot *et al.*, 2005; Shevach, 2006; Shevach *et al.*, 2006). D'autres cytokines, dont l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21, partageant la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 semblent aussi favoriser le développement et le maintien des cellules TregN mais leur impact est mineur comparativement à l'IL-2 (Sakaguchi *et al.*, 2008). L'IL-2 étant produite majoritairement par les cellules T effectrices suite à leur activation, sa sécrétion pourrait représenter un mécanisme régulateur de la réponse immunitaire via l'activation des cellules TregN.

#### **1.2.1.4. Activité suppressive des cellules T régulatrices naturelles**

Une fois produites dans le thymus, les cellules TregN vont migrer en périphérie pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (plus particulièrement, les ganglions lymphatiques) afin d'assurer le contrôle du système immunitaire (Sakaguchi *et al.*, 2008). Grâce à l'expression de diverses molécules d'adhésion et de récepteurs aux chimiokines, les cellules TregN possèdent aussi la capacité d'infiltrer les tissus inflammés.

#### Activation des cellules TregN et modulation de leur activité suppressive :

Contrairement aux cellules T conventionnelles (cellules CD4<sup>+</sup> auxiliaires) qui doivent subir un processus de différenciation en cellules Th1 ou Th2 suite à la reconnaissance des complexes CMH-II / peptide via leur TCR afin de développer leurs fonctions effectrices, les cellules TregN sont matures et capables d'exercer leur capacité suppressive directement. Afin d'exercer leur pouvoir suppressif, les cellules TregN doivent préalablement être stimulées de manière spécifique via leur TCR. La concentration d'antigène nécessaire à l'activation des cellules TregN est de 10 à 100 fois inférieure à celle nécessaire aux cellules T effectrices conventionnelles (Takahashi *et al.*, 1998). Contrairement aux cellules T conventionnelles, suite à la stimulation de leur TCR, les cellules TregN ne prolifèrent pas *in vitro* et de ce fait ont longtemps été considérées anergiques. En réalité, il semblerait que, malgré cette apparente anergie *in vitro*, elles prolifèrent correctement *in vivo* suite à leur stimulation via le TCR (Walker *et al.*, 2003; Sakaguchi *et al.*, 2008). Ainsi, d'autres stimuli (possiblement l'IL-2 et/ou l'IL-15) (Dieckmann *et al.*, 2001; Holm, Nielsen et Claesson, 2004),

vraisemblablement fournis par le microenvironnement *in vivo*, seraient nécessaires à leur prolifération.

La stimulation de certains récepteurs exprimés à la surface des cellules TregN joue un rôle clef dans la modulation de leur activité suppressive (Sakaguchi, 2003). Ainsi, il a été démontré que la stimulation du CTLA-4 (récepteur des molécules B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) des CPA) entraîne une augmentation de l'activité suppressive des cellules TregN (Takahashi *et al.*, 2000). En revanche, la stimulation *in vitro* du GITR (de l'anglais « glucocorticoid-induced TNF receptor ») en présence d'IL-2 déclenche la prolifération des cellules TregN et la perte de leur capacité à réprimer la prolifération de cellules T effectrices en co-culture (Shimizu *et al.*, 2002). L'utilisation d'anticorps agonistes du GITR *in vivo* conduit au développement de maladies auto-immunes suggérant encore une fois que l'activité suppressive des cellules TregN est inopérante suite à la stimulation de ce récepteur (McHugh *et al.*, 2002; Sakaguchi *et al.*, 2008). Cependant, il reste à déterminer si l'effet du GITR est dû à l'inhibition de l'activité suppressive des cellules TregN ou s'il affecte plutôt les cellules T effectrices en les rendant insensibles à la suppression (Sakaguchi *et al.*, 2008). De manière intéressante, il a été proposé que les cellules TregN auraient leur capacité suppressive temporairement réduite lors de leur prolifération (Takahashi *et al.*, 1998; Holm, Nielsen et Claesson, 2004; Suttmüller *et al.*, 2006). La stimulation des TLR2 et 4 couplée à l'interaction avec le TCR induit la prolifération des cellules TregN et module leur activité suppressive (Caramalho *et al.*, 2003; Suttmüller *et al.*, 2006). La stimulation du GITR et plus particulièrement celle des TLR décrivent deux mécanismes par lesquels les cellules T effectrices peuvent échapper au contrôle des cellules TregN. Ces études pourraient permettre d'expliquer pourquoi les cellules TregN inhibent complètement les réactions auto-immunes tout en permettant le développement des réponses contre les pathogènes. En plus de ces deux mécanismes, il a été démontré que certaines conditions peuvent rendre les cellules T effectrices insensibles à l'inhibition par les cellules TregN. Ainsi, certaines cytokines pro-inflammatoires (dont l'IL-6) produites suite à la reconnaissance des pathogènes par les TLR rendent les cellules T effectrices insensibles à la suppression (Pasare et Medzhitov, 2003). Dans le même ordre d'idée, une forte stimulation des cellules T effectrices (stimulation du TCR et du récepteur CD28 en présence d'une forte concentration d'IL-2) permet aussi à ces

dernières d'échapper à la suppression (Takahashi *et al.*, 1998). Ainsi, l'activation de la sécrétion de cytokines inflammatoires et l'induction de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 (capables de lier le CD28 des cellules T) à la surface des CPA pourraient rendre les cellules T effectrices insensibles à la suppression des cellules TregN et permettre le développement de la réponse immunitaire contre les pathogènes.

#### Mécanismes immunosuppresseurs employés par les cellules TregN :

Suite à leur activation par leur antigène spécifique, les cellules TregN acquièrent la capacité de supprimer l'ensemble des cellules T effectrices même si ces dernières présentent une spécificité antigénique différente. L'activité suppressive des cellules TregN a dans un premier temps été mise en évidence avec des expériences de co-culture *in vitro* montrant que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (cellules TregN) étaient capables d'inhiber la prolifération et la sécrétion de cytokines (IL-2 et IFN- $\gamma$  en particulier) des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (cellules T effectrices) (Takahashi *et al.*, 1998; Thornton et Shevach, 1998; Piccirillo et Shevach, 2001; Holm, Nielsen et Claesson, 2004). Pendant longtemps, la communauté scientifique a pensé que les cellules TregN exerçaient leur pouvoir suppressif via le contact cellulaire puisque le fait de placer les cellules TregN et les cellules T effectrices dans deux compartiments séparés par une membrane hémiperméable (transwell) empêchait la suppression (Thornton et Shevach, 1998; Dieckmann *et al.*, 2001). À la vue de ces résultats, l'implication de facteurs solubles suppressifs a été écartée et il a été proposé que la molécule CTLA-4 (Read, Malmstrom et Powrie, 2000; Salomon *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000) et le TGF- $\beta$  membranaire (Nakamura, Kitani et Strober, 2001) pourraient être impliqués dans l'activité suppressive des cellules TregN. Cependant, le fait que certains composés solubles soient hautement labiles et le fait que la plupart des médiateurs chimiques nécessitent d'être libérés en concentration importante à proximité de la cellule cible pour être efficaces ont remis en cause les conclusions découlant de l'utilisation de la technologie transwell (Vignali, Collison et Workman, 2008). En effet, la diffusion d'un compartiment à l'autre des éventuels facteurs solubles suppresseurs produits par les cellules TregN pourrait affecter significativement leur concentration et leur activité.

Bien que cela soit encore très controversé, divers facteurs solubles semblent être impliqués dans l'activité suppressive des cellules TregN (Shevach, 2006; Vignali, Collison et Workman, 2008). L'IL-10 et le TGF- $\beta$ , deux cytokines connues pour leurs propriétés suppressives (Roncarolo *et al.*, 2001), ont été proposés comme des facteurs solubles potentiellement liés à l'activité suppressive des cellules TregN. Bien que plusieurs études démontrent que l'incapacité de répondre à ces cytokines (absence de leur récepteur) ou leur neutralisation à l'aide d'anticorps n'affectent pas la capacité suppressive des cellules TregN (Takahashi *et al.*, 1998; Dieckmann *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2001; Piccirillo *et al.*, 2002), un nombre équivalent d'études montre le contraire (Annacker *et al.*, 2001; Nakamura, Kitani et Strober, 2001; Annacker *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2003; Hawrylowicz et O'Garra, 2005). D'autre part, il a été démontré que les cellules TregN sont capables d'induire la sécrétion de cytokines suppressives (IL-10 et/ou TGF- $\beta$ ) par les cellules T conventionnelles (Dieckmann *et al.*, 2002; Holm, Nielsen et Claesson, 2004). Ce phénomène pourrait expliquer comment un nombre si restreint de cellules TregN puisse exercer un si fort contrôle sur le système immunitaire juste par contact cellulaire. En plus du TGF- $\beta$  et de l'IL-10, l'IL-35, une cytokine exprimée préférentiellement par les cellules TregN, semble nécessaire à une activité suppressive optimale de ces dernières (Collison *et al.*, 2007; Vignali, Collison et Workman, 2008). Cette cytokine est un dimère composé de la sous-unité IL-12p35 de l'IL-12 associée au facteur Ebi3 (pour « Epstein Barr virus induced gene 3 »).

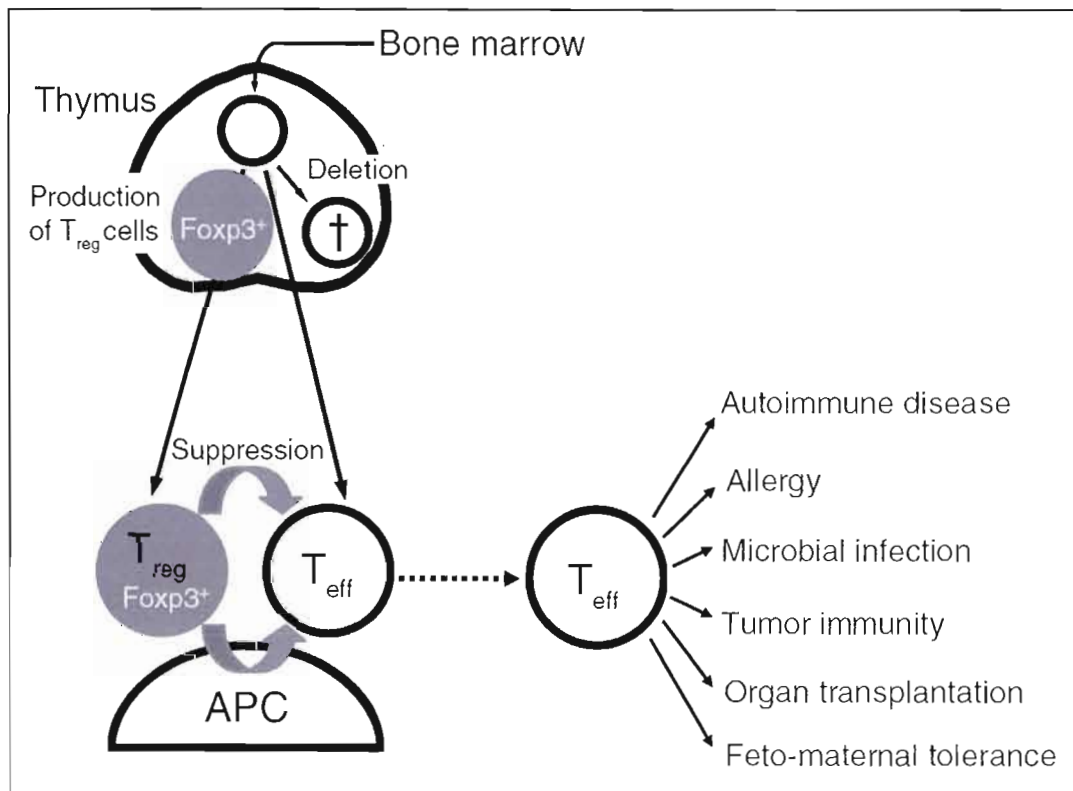
Plus récemment, d'autres mécanismes suppresseurs ont été découverts. Premièrement, les cellules TregN sont capables d'exprimer les molécules granzymes et perforine qui sont normalement associées à l'activité cytotoxique de cellules NK et des cellules T CD8<sup>+</sup> (Vignali, Collison et Workman, 2008) et sont ainsi capables de lyser divers types cellulaires (McHugh *et al.*, 2002; Herman *et al.*, 2004; Gondek *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007). Ces cellules semblent aussi exprimer TRAIL (pour « tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand ») (Ren *et al.*, 2007) et Galectin-1 (Garin *et al.*, 2007) qui pourraient conduire à l'apoptose des cellules cibles. Deuxièmement, les cellules TregN peuvent provoquer des dysfonctions métaboliques chez les cellules T effectrices. D'une part, les cellules TregN semblent capables d'appauvrir le milieu en certaines cytokines (dont l'IL-2) essentielles à la survie des cellules T effectrices et d'induire leur apoptose (Thornton et

Shevach, 1998; de la Rosa *et al.*, 2004; Pandiyan *et al.*, 2007). D'autre part, les cellules TregN expriment des ectoenzymes (CD39 et CD73) responsables de la production d'adénosine péri-cellulaire. En se fixant sur son récepteur ( $A_{2A}R$ ), l'adénosine va diminuer les fonctions effectrices des cellules T, favoriser la génération de cellules TregI et rendre les CD tolérogéniques (Vignali, Collison et Workman, 2008). Troisièmement, quelques études suggèrent que les cellules TregN agiraient en ciblant les CD (Vignali, Collison et Workman, 2008). Des expériences de microscopie intravitale ont permis de mettre en évidence des interactions entre les cellules TregN et les CD (Tadokoro *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006). De manière intéressante, les interactions entre cellules TregN et CD semblent plus fréquentes que celles entre cellules TregN et cellules T effectrices. L'interaction avec les cellules TregN semble induire l'expression de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) chez les CD (Fallarino *et al.*, 2003) et diminuer leur capacité à stimuler les cellules T effectrices en réduisant leur maturation ainsi que leur expression de molécules de costimulation (CD80 et CD86 en particulier) (Cederbom, Hall et Ivars, 2000; Misra *et al.*, 2004). Une fois activée, l'IDO va conduire à la production de métabolites pro-apoptotiques à partir du tryptophane. La suppression de CD par les cellules TregN pourrait être un autre mécanisme permettant d'expliquer comment un nombre si restreint de cellules TregN puisse exercer un si fort contrôle sur le système immunitaire juste par contact cellulaire. Cette suppression des CD semble dépendre de la fixation du CTLA-4 (Oderup *et al.*, 2006) et de LAG3 (pour « lymphocyte-activation gene 3 ») (ou CD223) (Huang *et al.*, 2004) des cellules TregN sur les molécules CD80/CD86 et le CMH-II, respectivement.

Ainsi, les cellules TregN disposent d'un nombre important de mécanismes immunosuppresseurs capables de contrôler la réponse immunitaire. L'importance de chacun de ces mécanismes reste à déterminer *in vivo*. Puisque la neutralisation de manières individuelle de plusieurs de ces mécanismes ne conduit pas au développement de réactions auto-immunes semblables à l'IPEX, il est vraisemblable que le contrôle du système immunitaire par les cellules TregN repose sur plusieurs de ces stratégies. Il est aussi possible d'envisager que ces différents mécanismes soient employés par différentes populations de cellules TregN ou bien que chacun d'entre eux soit adapté au contrôle de pathologies spécifiques (Vignali, Collison et Workman, 2008).

### 1.2.2. Rôle des cellules T régulatrices naturelles *in vivo*

Les cellules TregN contrôlent un large éventail de réactions immunitaires (Fig. 1.6) (Sakaguchi, 2005). Au départ, elles ont été identifiées pour leur capacité à inhiber les réactions auto-immunes. Ce n'est que plus récemment qu'il a été proposé que les cellules TregN interviendraient aussi lors des réactions de rejet de greffes, du contrôle des réactions anti-tumeurs et des réactions dirigées contre divers pathogènes (Mittrucker et Kaufmann, 2004; Belkaid et Rouse, 2005).



**Figure 1.6 : Schéma des différents rôles des cellules TregN**

Les cellules TregN sont produites dans le thymus et ont la capacité de réguler la maturation et la sécrétion de cytokines des cellules présentatrices d'antigène (APC de l'anglais « antigen presenting cell »). Elles sont aussi capables d'inhiber la sécrétion de cytokines et la prolifération des cellules T effectrices. Grâce à leurs capacités inhibitrices, les cellules TregN sont impliquées dans la modulation de diverses réactions immunitaires comme les maladies auto-immunes, les allergies et bien d'autres.

Source : (Sakaguchi, 2005)



### 1.2.2.1. Contrôle de la tolérance

Au cours de la génération des cellules T dans le thymus, les thymocytes passent successivement par deux étapes cruciales de délétion clonale qui vont déterminer leur élimination ou leur survie. La première étape consiste en une sélection positive qui va permettre la survie des thymocytes capables de reconnaître les peptides présentés par les complexes CMH du soi (Goldsby *et al.*, 2003). La seconde est une sélection négative qui a pour but d'éliminer tous les thymocytes ayant une affinité trop forte pour les peptides du soi (Goldsby *et al.*, 2003). Cette dernière étape vise à éviter la production de cellules T auto-réactives qui pourraient provoquer des maladies auto-immunes. Bien que cette étape élimine la grande majorité des cellules T auto-réactives, certaines parviennent à échapper à cette sélection et à rejoindre la périphérie. Afin de neutraliser ces cellules potentiellement dangereuses, l'organisme dispose de mécanismes protecteurs additionnels. D'une part, les cellules T auto-réactives peuvent être inactivées de manière définitive en périphérie lorsqu'elles rencontrent leur antigène en absence de costimulation. Ce phénomène est connu sous le nom d'anergie (Goldsby *et al.*, 2003; Sakaguchi *et al.*, 2008). D'autre part, les cellules TregN décrites précédemment ont pour rôle d'inhiber les cellules T auto-réactives afin d'éviter le développement de maladies auto-immunes (Sakaguchi *et al.*, 2008).

L'importance des cellules TregN dans le contrôle de la tolérance aux antigènes du soi a été démontrée à diverses reprises avec des expériences montrant que l'élimination ou l'absence de ces cellules provoquent l'apparition de pathologies auto-immunes malgré la présence d'autres types de cellules Treg (CD8<sup>+</sup>, Th3 ou Tr1 par exemple) (Sakaguchi, 2005). Les multiples maladies auto-immunes observées chez les souris *scurfy* et chez les individus possédant un gène *foxp3* dysfonctionnel en sont les meilleurs exemples (Bennett *et al.*, 2001; Brunkow *et al.*, 2001; Wildin *et al.*, 2001; Vignali, Collison et Workman, 2008). D'autres études ont aussi montré que les cellules TregN permettaient de contrôler l'homéostasie intestinale afin d'éviter les réactions inflammatoires inutiles contre la flore commensale (Belkaid et Rouse, 2005). Dans ces études, l'ajout de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> chez des souris dépourvues de cellules T provoquait le développement d'une inflammation massive de l'intestin. En revanche, l'administration de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en conjonction des cellules

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ne causait aucune lésion démontrant l'implication des cellules TregN dans l'homéostasie intestinale (Powrie *et al.*, 2003).

En plus de leur importance dans le contrôle de la tolérance, les cellules TregN semblent aussi impliquées dans le contrôle des réponses anti-tumeurs et de rejet de greffe. En effet, puisque la majorité des antigènes associés aux tumeurs sont des antigènes du soi, il est vraisemblable que les cellules TregN puissent interférer avec la réponse anti-tumeur (Boon *et al.*, 1994; Dunn, Old et Schreiber, 2004). Des expériences visant à éliminer les cellules TregN ou à moduler leur capacité suppressive ont permis d'accroître la réponse anti-tumeur (Sutmoller *et al.*, 2001; Phan *et al.*, 2003; Sakaguchi, 2005). Le but ultime des transplantations d'organe est d'établir une tolérance envers le greffon. Dans ce sens, plusieurs études essaient actuellement de générer des cellules TregN spécifiques des antigènes du greffon afin de les injecter au receveur pour favoriser l'acceptation de la greffe.

#### 1.2.2.2. Implication dans la résolution des maladies infectieuses

Les cellules TregN répondent à une grande diversité d'antigènes du soi. Bien que la diversité du répertoire des cellules T effectrices et des cellules TregN paraisse aussi large, il semblerait que ces dernières reconnaissent majoritairement des peptides du soi (Belkaid et Rouse, 2005; Sakaguchi, 2005; Sakaguchi *et al.*, 2008). Ce n'est que récemment que certaines études ont permis de suggérer que les cellules TregN soient capables de reconnaître les antigènes de certains pathogènes (Belkaid *et al.*, 2002; Maloy *et al.*, 2003; Hesse *et al.*, 2004) et qu'elles pourraient ainsi moduler la réponse immunitaire contre ces derniers (Belkaid et Rouse, 2005). La première étude démontrant que les cellules TregN pouvaient avoir pour cible la réponse immunitaire contre un pathogène a été réalisée avec le pathogène intestinal *Helicobacter pylori*. Chez des souris RAG (pour « recombinant-activating gene ») knock-out (souris dépourvues de cellules B et T), l'infection par *Helicobacter pylori* donne lieu à une inflammation intestinale modérée et le transfert de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> aggrave significativement cette pathologie. Cette étude a mis en évidence que l'ajout de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> permettait de réduire fortement l'inflammation démontrant ainsi pour la première fois que les cellules TregN pouvaient moduler une réponse immunitaire dirigée contre un pathogène. Ces observations ont été extrapolées à d'autres pathogènes dont



*Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Leishmania major*, *Schistosoma* et le virus de l'hépatite C (résumé dans (Belkaid et Rouse, 2005)). Dans ces infections, les cellules TregN semblent jouer un rôle bénéfique pour l'hôte en limitant l'inflammation et la pathologie, parfois excessives, induites par la réponse anti-pathogène (Belkaid et Rouse, 2005). La contrepartie consentie par l'organisme suite à l'intervention des cellules TregN est la survie prolongée des pathogènes et parfois leur persistance à long terme.

De manière générale et en accord avec les études décrites à l'instant, les cellules TregN semblent permettre une régulation fine de la réponse immunitaire servant à la fois les intérêts du pathogène et de l'hôte. Cependant, dans certaines infections, dont les infections par *Plasmodium*, par les virus *Herpes simplex*, *Friend Leukemia virus* et *VIH*, l'activation des cellules TregN semble défavorable à l'hôte en inhibant la réponse immunitaire et en favorisant le développement incontrôlé du pathogène (Belkaid et Rouse, 2005). Comme décrit précédemment pour le *Plasmodium* (voir par. 1.1.4.3 et 1.1.6.1), les siècles d'interactions entre les pathogènes et leur hôte ont permis à ceux-ci de développer divers mécanismes leur permettant d'échapper au système immunitaire. Dans ce contexte, il est envisageable que certains pathogènes aient développé la capacité d'activer ou de sur-activer les cellules TregN afin de favoriser leur persistance.

Que le rôle des cellules TregN soit bénéfique ou néfaste pour l'hôte, il semblerait que l'activation de ces cellules soit un caractère récurrent observé lors des infections. Ainsi, plusieurs études rapportent que les infections par divers pathogènes induisent la sécrétion de cytokines suppressives comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , l'apparition de marqueurs d'activation à la surface des cellules TregN ainsi que l'augmentation de l'activité suppressive de ces dernières (Belkaid et Rouse, 2005). L'activation des cellules TregN pendant les infections pourrait provenir de la stimulation de leur TCR et/ou de leurs TLR par les antigènes et/ou les PAMP des pathogènes (Belkaid et Rouse, 2005). Il est aussi envisageable que l'inflammation associée à l'infection cause la destruction de certains tissus et libère ainsi certains antigènes du soi qui pourraient activer les cellules TregN impliquées dans la tolérance. En plus de leur activation, il a été observé que les cellules TregN s'accumulent au site d'infection lors des infections par *Leishmania*, *Schistosoma*, le virus *Herpes simplex* et le virus *VIH* (résumé dans (Belkaid et Rouse, 2005)). Finalement, la forte production de TGF- $\beta$  souvent associée aux

infections chroniques pourrait favoriser le recrutement et la survie des cellules TregN (Belkaid et Rouse, 2005).

### 1.2.2.3. Cas particulier de la malaria

Récemment, la fonction des cellules TregN pendant les infections par *Plasmodium* a suscité l'intérêt de la communauté scientifique (Riley *et al.*, 2006; Hansen et Schofield, 2010). Leur activation pourrait notamment jouer un rôle dans l'immunosuppression observée lors des infections par *Plasmodium* ou encore expliquer le développement lent d'une immunité partielle contre la réinfection.

#### Informations obtenues à l'aide de modèles murins :

La déplétion *in vivo* des cellules TregN à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD25 a été réalisée afin d'étudier le rôle de ces cellules pendant les infections par *Plasmodium*. Une première équipe a montré que la déplétion des cellules TregN permet de ralentir la multiplication du *Plasmodium berghei* NK65 (*PbNK65*) chez les souris BALB/c. Toutefois, ce traitement ne semble avoir aucun impact sur la mortalité (Long *et al.*, 2003). Une seconde équipe a pu observer que suite au traitement avec ce même type d'anticorps, l'infection par *PyL* normalement létale, est contrôlée (Hisaeda *et al.*, 2004). De plus, l'immunosuppression affectant les cellules T effectrices lors des infections par ce parasite est fortement réduite en absence de cellules TregN (Hisaeda *et al.*, 2004). Ces deux études suggèrent que l'activation des cellules TregN lors des infections par *Plasmodium* permettrait au parasite d'induire un état d'immunosuppression lui permettant d'échapper au système immunitaire.

#### Informations obtenues chez l'homme :

Une étude clinique réalisée sur 26 patients en début d'infection par *Plasmodium falciparum* a montré que, chez certains individus, un pic de TGF- $\beta$  est observable environ 12 h après l'apparition du parasite dans le sang alors que, chez d'autres, une quantité beaucoup plus faible de cette cytokine est mesurée. Suite à ce pic important de TGF- $\beta$ , une augmentation du nombre de cellules TregN ainsi qu'un accroissement de la vitesse de réplication du parasite ont été décrits. Ainsi, il semblerait que, chez certaines personnes, les

cellules TregN puissent être induites de manière précoce durant l'infection favorisant ainsi la prolifération du parasite (Walther *et al.*, 2005). Ce phénomène pourrait être à la base du développement d'infections associées à une pathologie et une mortalité plus importantes.

### **1.3. Impact de l'HE et de l'HZ sur la production d'interleukine-12 des macrophages**

Lors d'une infection par un pathogène, la première réponse de l'organisme est l'induction d'une réponse inflammatoire qui va conduire à l'altération de la perméabilité vasculaire, la migration de cellules immunitaires ainsi que la production de diverses cytokines et chimiokines (Goldsby *et al.*, 2003). L'IL-12 sécrétée par les phagocytes suite à la reconnaissance des pathogènes via les TLR est d'une importance capitale dans le développement de l'inflammation et l'activation de la réponse immunitaire innée (Goldsby *et al.*, 2003). Pendant les infections par *Plasmodium*, la production systémique d'IL-12 est défectueuse (Keller *et al.*, 2006), ce qui semblerait être associé à un contrôle inadéquat du parasite (Sedegah, Finkelman et Hoffman, 1994; Hoffman *et al.*, 1997) ainsi qu'à une pathologie exacerbée (Chaisavaneeyakorn *et al.*, 2003; Chaiyaroj *et al.*, 2004). De plus, les phagocytes prélevés à partir de souris infectées par le *Plasmodium* ou de patients atteints de la malaria montrent aussi une capacité réduite à produire de l'IL-12 (Xu *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2006; Wykes *et al.*, 2007; Wykes et Good, 2008). Les composés ferriques dont l'HZ et l'HE, ingérés en large quantité par les MP lors des infections par *Plasmodium* (voir par. 1.3.2.1), sont connus pour moduler la production de diverses cytokines (voir par. 1.3.2.3) et pourraient être impliqués dans la suppression de l'IL-12.

#### **1.3.1. L'interleukine 12**

L'IL-12 a été découverte en 1989 et était initialement appelée NKSF (pour « natural killer cell stimulating factor ») pour sa capacité à activer la production d'IFN- $\gamma$  des cellules NK (Kobayashi *et al.*, 1989). Ensuite, une molécule connue sous le nom de CLMF (pour « cytotoxic lymphocyte maturation factor ») pour sa capacité à stimuler la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques s'est avérée être identique au NKSF et ces deux molécules sont désormais appelées IL-12 (Stern *et al.*, 1990). Cette cytokine est produite par divers types cellulaires dont les mastocytes, les polynucléaires et les kératinocytes. Cependant, les cellules de la lignée monocytes/MP (monocytes, MP, cellules de Kupffer, cellules mésangiales et

cellules gliales) et les CD sont les productrices principales de cette cytokine (Trinchieri *et al.*, 1993; Kang, Kim et Kim, 2005). La forme active de cette cytokine, l'IL-12p70, est un hétérodimère composé de deux sous-unités appelées IL-12p35 et IL-12p40 en raison de leurs poids moléculaires respectifs de 35 kDa et 40 kDa (Trinchieri, 2003). Ces deux sous-unités sont produites par deux gènes régulés de manière indépendante et sont reliées par un pont disulfure (Trinchieri, 2003). Dans la suite du document, le terme IL-12 référera à l'IL-12p70.

### 1.3.1.1. Induction de la production d'IL-12

L'IL-12 peut être produite et sécrétée selon deux mécanismes distincts (Trinchieri, 2003; Kang, Kim et Kim, 2005). D'une part, cette cytokine est produite suite à la stimulation du CD40 des MP par le ligand du CD40 exprimé par les cellules T. D'autre part, l'IL-12 est sécrétée suite à la reconnaissance des pathogènes via les TLR présents à la surface des MP (Gerber et Mosser, 2001). Ce dernier mécanisme retiendra plus particulièrement notre attention.

#### Induction de la production d'IL-12 par la voie métabolique des TLR :

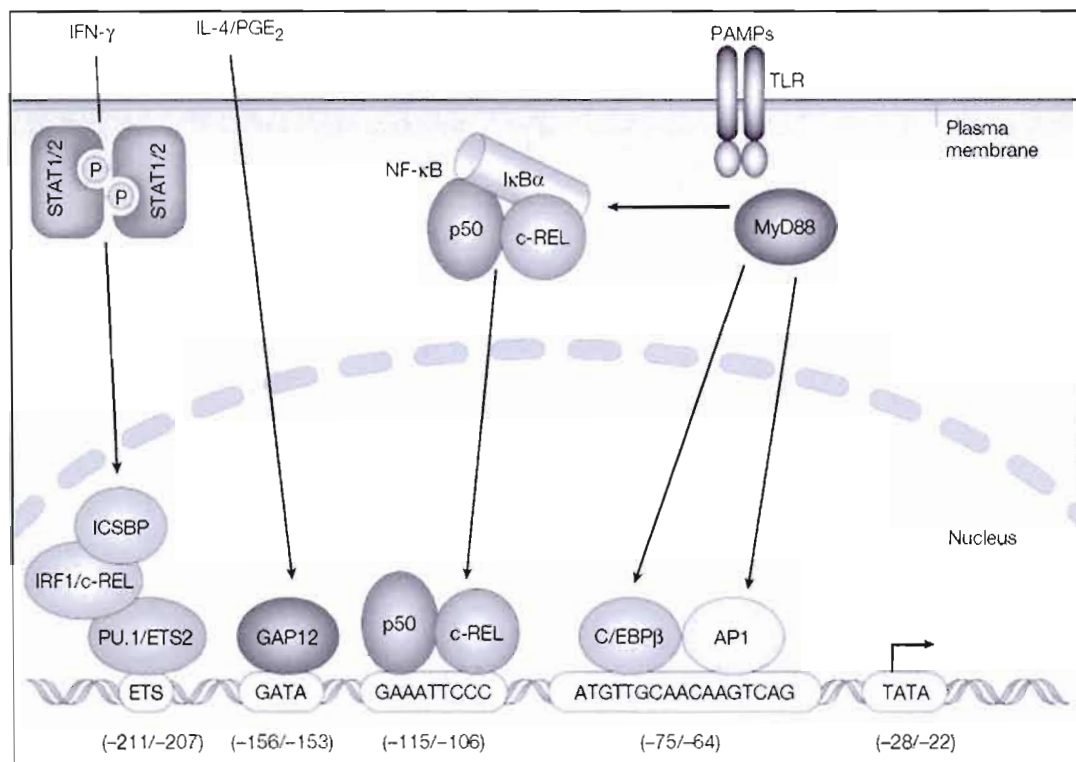
En absence de stimulation, la sous-unité IL-12p35 est faiblement exprimée alors que l'expression de la sous-unité IL-12p40 est nulle (Snijders *et al.*, 1996; Du et Sriram, 1998; Isler *et al.*, 1999). Bien que les agonistes des différents TLR soient capables d'induire la production d'IL-12 selon des voies métaboliques similaires (Gerber et Mosser, 2001; Aramaki *et al.*, 2002; Kang, Kim et Kim, 2005), la majorité des informations concernant les voies métaboliques impliquées dans l'induction de l'IL-12 par les TLR provient d'études ayant évalué la stimulation des MP avec le LPS (Trinchieri, 2003; Kang, Kim et Kim, 2005). La fixation du LPS sur le TLR4 induit l'expression de la sous-unité IL-12p40 et la surexpression de la sous-unité IL-12p35 grâce à l'activation de divers facteurs de transcription dont le NF $\kappa$ B et les IRF (pour « interferon regulatory transcription factor ») (en particulier IRF1, IRF2, IRF3, IRF5, IRF7 et IRF8 aussi connu sous le nom ICSBP pour « interferon consensus sequence-binding protein ») (Du et Sriram, 1998; Isler *et al.*, 1999; Salkowski *et al.*, 1999; Kang, Kim et Kim, 2005; Zhao *et al.*, 2006). De plus, l'activation de la MAPK p38 (isoforme p38 $\alpha$  majoritairement) semble importante dans la synthèse de l'IL-

12 puisque les MP des souris MKK3<sup>-/-</sup> (pour « MAPK kinase 3 »), une des deux kinases responsables de l'activation de la MAPK p38, présentent une expression anormalement réduite des sous-unités IL-12p40 et IL-12p35 en réponse au LPS (Lu *et al.*, 1999). Cependant, l'effet de la MAPK p38 sur la production d'IL-12 semble dépendre de divers facteurs dont le type cellulaire, l'intensité de stimulation (LPS, IFN- $\gamma$ /LPS et la concentration d'IFN- $\gamma$ ) ainsi que la concentration d'IL-10 (Hacker *et al.*, 1998; Marriott, Clarke et Dalglish, 2001; Salmon *et al.*, 2001; Utsugi *et al.*, 2003; Cambos *et al.*, 2010). La sous-unité IL-12p40 est exprimée en large excès comparativement à l'IL-12p70 suggérant que la formation de la sous-unité IL-12p35 serait l'étape limitante de la synthèse de l'hétérodimère (Snijders *et al.*, 1996; Trinchieri, 2003). L'expression des sous-unités IL-12p35 et IL-12p40 semble régulée majoritairement au niveau transcriptionnel (Ma *et al.*, 1996; Snijders *et al.*, 1996) même si des modifications post-transcriptionnelles et la modulation de la traduction pourrait aussi intervenir (Trinchieri *et al.*, 1993; Trinchieri, 2003; Kang, Kim et Kim, 2005).

#### Activation de la transcription des gènes *IL-12p40* et *IL-12p35* :

Les gènes des sous-unités de l'IL-12 ont été clonés en 1996 permettant l'identification de nombreux sites de fixation spécifiques à différents facteurs de transcription (Yoshimoto *et al.*, 1996). Le promoteur du gène *IL-12p40* possède des sites de reconnaissance pour NF $\kappa$ B, C/EBP  $\beta$  (pour « CCAAT / enhancer binding protein  $\beta$  »), ETS-2 (pour « E-twenty six 2 ») et EKLf (pour « Erythroid Krüppel-like Factor »). Il possède aussi le site ISRE (pour « interferon-stimulated response element ») capable de reconnaître les IRF et le site GAS (pour « gamma-interferon activating site ») (Salkowski *et al.*, 1999; Trinchieri, 2003; Luo *et al.*, 2004; Kang, Kim et Kim, 2005; Zhao *et al.*, 2006) (Fig. 1.7). De son côté, le promoteur du gène *IL-12p35* est moins connu mais semble posséder des sites de fixation putatifs pour les facteurs de transcription Sp1, C/EBP  $\beta$ , ETS-2, NF $\kappa$ B et IRF (Liu *et al.*, 2003; Trinchieri, 2003; Kang, Kim et Kim, 2005; Goriely *et al.*, 2006). Bien que de nombreux facteurs de transcription semblent impliqués dans l'induction de la production de l'IL-12 (Salkowski *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003; Trinchieri, 2003; Luo *et al.*, 2004; Goriely *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006), la fixation du NF $\kappa$ B sur le promoteur est essentielle (Qi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). La fixation du LPS sur son récepteur induit l'activation de la voie métabolique du NF $\kappa$ B et la translocation des hétérodimères p50/p65 et p50/c-Rel ainsi que de l'homodimère p50/p50.

Des études additionnelles ont démontré que l'expression de la sous-unité IL-12p40 diminuait fortement chez les MP des souris  $c\text{-Rel}^{-/-}$  alors qu'elle n'était que modestement affectée chez les MP des souris  $p65^{-/-}$  démontrant l'importance capitale de l'hétérodimère p50/c-Rel dans la production d'IL-12 (Sanjabi *et al.*, 2000).



**Figure 1.7: Quelques aspects de la régulation de la transcription du gène *IL-12p40***

Le séquençage du gène de l'*IL-12p40* a permis d'identifier des sites potentiels de fixation à l'ADN de divers facteurs de transcription sur son promoteur. En particulier, on remarque que divers facteurs de transcription activés par l'IFN-γ et la stimulation des TLR (par le LPS, par exemple) possèdent des sites de fixation au niveau du promoteur du gène de l'*IL-12p40*.

Source : (Trinchieri, 2003)

### 1.3.1.2. Régulation de la sécrétion d'IL-12 induite par les TLR

#### Rôle de la balance redox intracellulaire:

Le statut redox intracellulaire joue un rôle prépondérant dans diverses fonctions cellulaires ainsi que dans la production de plusieurs cytokines (Schenk *et al.*, 1996; Nakamura, Nakamura et Yodoi, 1997). De manière intéressante, il a été rapporté que le statut redox de la cellule influence l'activation et la fixation à l'ADN du NF $\kappa$ B, un facteur de transcription essentiel à la synthèse de l'IL-12 (Schreck, Rieber et Baeuerle, 1991; Matthews *et al.*, 1992; Hayashi, Ueno et Okamoto, 1993). Diverses expériences visant à moduler le ratio glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) des MP ont démontré l'importance du statut redox intracellulaire dans la production d'IL-12. Ainsi, le traitement de MP avec les oxydants diéthylmaléate (DEM) ou butyl-sufoimine (BSO) a permis de diminuer significativement le ratio GSH/GSSG entraînant une inhibition significative de la synthèse d'IL-12 en réponse au LPS (Peterson *et al.*, 1998; Dobashi *et al.*, 2001; Murata, Shimamura et Hamuro, 2002; Utsugi *et al.*, 2002; Komatsu *et al.*, 2003). En revanche, une augmentation du ratio GSH/GSSG avec des agents réducteurs comme le N-Acetyl Cystéine (NAC) ou le GSH a quant à elle permis d'accroître la sécrétion d'IL-12 tout en inhibant celle de son inhibiteur l'IL-10 (Dobashi *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2002; Murata, Shimamura et Hamuro, 2002; Utsugi *et al.*, 2002). En résumé, ces études suggèrent qu'un environnement intracellulaire réduit favorise la sécrétion d'IL-12 par les MP en réponse au LPS. De manière intéressante, deux études contredisent ce phénomène en suggérant que l'ajout d'agents réducteurs (thiols ou NAC) diminuerait l'expression d'IL-12 des MP en réponse à la combinaison IFN- $\gamma$  / *Staphylococcus aureus* Cowan strain I ou à la stimulation avec le CpG oligodéoxynucléotides (CpG-ODN) (un agoniste du TLR9) (Aramaki *et al.*, 2002; Mazzeo *et al.*, 2002). L'activation du NF $\kappa$ B et le niveau d'expression des ARN messagers des sous-unités IL-12p35 et IL-12p40 n'étant pas affectés par les agents réducteurs dans ces études, les auteurs ont suggéré que l'inhibition de l'IL-12 serait due à une inhibition de l'assemblage intracellulaire des deux sous-unités composant cette cytokine en présence de thiols ou de NAC.



### Implication des cytokines :

La sécrétion d'IL-12 peut être modulée par différentes cytokines. Certaines comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF (pour « granulocyte macrophage colony-stimulating factor ») peuvent augmenter sa sécrétion alors que d'autres comme l'IL-10, l'IL-4, l'IL-11, l'IL-13, le TGF- $\beta$ , l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$  peuvent l'inhiber (Snijders *et al.*, 1996; Kang, Kim et Kim, 2005). Ces cytokines agissent principalement en modulant la transcription des deux sous-unités ou la stabilité de leur acide désoxyribonucléique (ARN) messager (Trinchieri, 2003). L'IFN- $\gamma$  et l'IL-10 sont reconnus pour être respectivement l'inducteur et le répresseur principal de la production d'IL-12 en réponse au LPS (Ma *et al.*, 2003; Hoentjen *et al.*, 2005).

Les souris IL-10<sup>-/-</sup> développent rapidement une importante inflammation intestinale causée par une production exacerbée d'IL-12 démontrant que l'IL-10 est l'un des principaux inhibiteurs de l'IL-12 (Hoentjen *et al.*, 2005). L'IL-10 agirait en diminuant l'activation du NF $\kappa$ B et sa fixation sur le promoteur *IL-12p40* via l'activation de STAT3 (pour « signal transducer and activator of transcription 3 ») (Aste-Amezaga *et al.*, 1998; Du et Sriram, 1998; Bhattacharyya *et al.*, 2004; Hoentjen *et al.*, 2005). L'IL-10 peut aussi moduler les voies MAPK p38 (Niuro *et al.*, 1998; Lee et Chau, 2002) et AKT/PI3K (pour « phosphatidylinositol-3-kinase »). L'inhibition de l'IL-12 est souvent associée à une surexpression de l'IL-10 (et inversement : cytokines régulées de manière réciproque) (Feng *et al.*, 2002; Murata, Shimamura et Hamuro, 2002; Trinchieri, 2003). Cependant, la diminution de l'IL-12 n'est pas toujours dépendante de l'IL-10 (Trinchieri, 2003). Lors de la stimulation des MP par le LPS, une quantité significative d'IL-10 est sécrétée inhibant partiellement la production d'IL-12 (Foey *et al.*, 1998; Isler *et al.*, 1999; Gerber et Mosser, 2001; Ma *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Xia et Kao, 2003).

La stimulation des MP par le LPS induit une expression réduite des sous-unités IL-12p35 et IL-12p40 sans permettre la sécrétion d'une quantité importante d'IL-12 (Isler *et al.*, 1999; Trinchieri, 2003; Saito, Matsuura et Hirai, 2006). Comme décrit précédemment, l'IFN- $\gamma$  est reconnu pour jouer un rôle synergique avec la stimulation des TLR en ce qui concerne la synthèse de diverses cytokines inflammatoires dont l'IL-12 (Zhao *et al.*, 2006). Suite à sa fixation sur son récepteur et à l'activation de STAT1 (Ma *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006),

cette cytokine permet d'exacerber la transcription des sous-unités de l'IL-12 et sa sécrétion (Ma *et al.*, 1996; Snijders *et al.*, 1996; Isler *et al.*, 1999; Salkowski *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2000). L'effet synergique de l'IFN- $\gamma$  semble reposer principalement sur l'inhibition de la sécrétion d'IL-10 en réponse au LPS (Isler *et al.*, 1999; Cambos *et al.*). D'autre part, Utsugi *et al.* et Dobashi *et al.* ont démontré que l'IFN- $\gamma$  provoquait une augmentation du ratio GSH/GSSG responsable de l'augmentation de l'activation de la MAPK p38 et de l'accroissement de l'expression des sous-unités de l'IL-12 (Dobashi *et al.*, 2001; Utsugi *et al.*, 2002). L'IFN- $\gamma$  active divers facteurs de transcription dont IRF1 et IRF8 mais son rôle concernant l'activation et la fixation du NF $\kappa$ B à l'ADN reste controversé (Salkowski *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2006). En plus de son rôle sur la transcription des gènes *IL-12p35* et *IL-12p40*, il a aussi été suggéré que l'IFN- $\gamma$  pourrait agir au niveau de la formation de l'hétérodimère en permettant un ratio idéal entre les sous-unités IL-12p35 et la IL-12p40 ou encore en modulant leurs modifications post-transcriptionnelles (Trinchieri, 2003).

#### Implication de la stimulation des récepteurs membranaires des phagocytes :

La synthèse d'IL-12 est aussi inhibée par la stimulation de certains récepteurs des phagocytes (Gerber et Mosser, 2001; Trinchieri, 2003). Ainsi, l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique, produit suite à la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G comme les récepteurs de la prostaglandine E2 (PGE2), de l'adénosine A2a, de l'histamine ou encore des peptides intestinaux vasoactifs (Feng *et al.*, 2002; Trinchieri, 2003), diminue la sécrétion d'IL-12. L'AMP cyclique semble inhiber l'activation de la MAPK p38 sans toutefois modifier celle du NF $\kappa$ B en réponse au LPS (Feng *et al.*, 2002). De même, la fixation du virus de la rubéole ou du fragment C3b du complément sur le récepteur CD46, la fixation du fragment iC3b sur le récepteur du complément 3 (CR3), la fixation de la thrombospondine sur le récepteur CD47 ou encore la fixation de complexes immuns sur les FcR entraînent une inhibition de la sécrétion d'IL-12 (Trinchieri, 2003).

### 1.3.1.3. Fonctions effectrices de l'IL-12

Une cytokine à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative :

L'IL-12 est l'un des premiers médiateurs chimiques sécrétés par les MP en réponse à une infection. Cette cytokine est reconnue par le récepteur IL-12R composé de deux sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  et exprimé par les cellules T, les cellules NK, les CD et les cellules B. La fixation de l'IL-12 sur son récepteur provoque l'activation de la kinase Lck (pour « lymphocyte-specific protein tyrosine kinase ») et de la MAPK p38 ainsi que des facteurs de transcription STAT1, STAT3, STAT4 et STAT5 (Kang, Kim et Kim, 2005). Une étude avec des souris STAT4<sup>-/-</sup> a démontré que STAT4 est le facteur responsable de la majorité des effets de l'IL-12 (Thierfelder *et al.*, 1996).

L'IL-12 induit la sécrétion de diverses cytokines chez les cellules T et les cellules NK. Bien que cette cytokine induise le TNF- $\alpha$ , le GM-CSF, le M-CSF (pour « macrophage colony-stimulating factor »), l'IL-3, l'IL-8 et l'IL-2, l'effet inducteur principal touche la sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui est responsable en grande partie des propriétés pro-inflammatoires de l'IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1992; Trinchieri, 2003; Kang, Kim et Kim, 2005). L'IFN- $\gamma$  va activer les MP, accroître leur capacité antimicrobienne et induire la sécrétion de composés inflammatoires dont de NO, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 (Janeway *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2003; Gordon, 2003).

L'IL-12 permet aussi la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) et des cellules LAK (pour « lymphocyte-activated killer ») ainsi que l'exacerbation de leur activité. L'IL-12 en combinaison avec d'autres facteurs joue aussi un rôle important dans la survie et la prolifération des précurseurs hématopoïétiques ainsi que dans l'hématopoïèse et l'érythropoïèse (Dybedal, Larsen et Jacobsen, 1995; Kang, Kim et Kim, 2005). L'IL-12 joue aussi un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire adaptative en contrôlant la différenciation Th1/Th2 (Hsieh *et al.*, 1993; Romagnani, 1999; Murata, Shimamura et Hamuro, 2002). Il est maintenant largement accepté que l'IL-12 est essentielle à la différenciation des cellules Th0 (cellules T CD4<sup>+</sup> non différenciées) en cellules Th1 et à celle des cellules T CD8<sup>+</sup> en LTC ainsi que dans l'activation des NK (Romagnani, 1999). Les cellules Th1 sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  permettant l'activation des MP et des

cellules B (Romagnani, 1999). La réponse de type Th1 est particulièrement importante dans la lutte contre les parasites intracellulaires comme le *Plasmodium* (Romagnani, 1996).

Bien que l'IL-12 soit nécessaire au contrôle des infections par les parasites intracellulaires ou les bactéries (Trinchieri et Scott, 1994; Trinchieri, 1998; Alber *et al.*, 2006), cette cytokine peut aussi conduire à une inflammation excessive responsable des pathologies associées à plusieurs maladies auto-immunes ainsi qu'aux chocs septiques (Wysocka *et al.*, 1995; Salkowski *et al.*, 1999; Marriott, Clarke et Dalglish, 2001; Trinchieri, 2003). L'effet pathologique de l'IL-12 semble relié à une induction excessive de la production de TNF- $\alpha$  (Orange *et al.*, 1995).

#### Rôle de l'IL-12 pendant les infections par *Plasmodium* :

Comme décrit précédemment, l'une des pathologies principales associées à la malaria est le développement d'une anémie sévère suite à la lyse des GR et à l'inhibition de l'érythropoïèse. Bien que certaines cytokines pro-inflammatoires soient capables d'inhiber l'érythropoïèse (Means et Krantz, 1992; Chang et Stevenson, 2004), Stevenson *et al.* ont démontré que le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  n'étaient pas responsables de la dysérythropoïèse observée pendant les infection par *Plasmodium* (Yap et Stevenson, 1994). En parallèle, des études utilisant un modèle murin (Mohan et Stevenson, 1998; Sam et Stevenson, 1999) et plusieurs études épidémiologiques (Luty *et al.*, 2000; Perkins, Weinberg et Kremsner, 2000; Malaguarnera *et al.*, 2002; Malaguarnera *et al.*, 2002; Chaisavaneeyakorn *et al.*, 2003; Chaiyaroj *et al.*, 2004) ont démontré que la sévérité de l'anémie malarique était en corrélation inverse avec la quantité d'IL-12 produite. L'IL-12 étant capable de stimuler l'érythropoïèse *in vitro* (Dybedal, Larsen et Jacobsen, 1995; Kang, Kim et Kim, 2005), l'addition d'IL-12 recombinante a été évaluée afin de restaurer l'érythropoïèse et de favoriser la résolution des infections par *Plasmodium*. Plusieurs études menées avec différents modèles murins et simiens ont démontré que l'ajout d'IL-12 recombinante permettait une stimulation de l'érythropoïèse et une restauration de l'hématocrite (Mohan et Stevenson, 1998; Mohan, Sam et Stevenson, 1999; Normaznah *et al.*, 1999). De plus, l'administration de cette cytokine permettait une meilleure protection et un meilleur contrôle de la parasitémie (Sedegah, Finkelman et Hoffman, 1994; Hoffman *et al.*, 1997; Mohan, Sam et Stevenson, 1999;

Normaznah *et al.*, 1999). Les effets protecteurs de l'IL-12 recombinante sont dus à une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de NO lors des infections par *Plasmodium* (Sedegah, Finkelman et Hoffman, 1994; Stevenson *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 1997). De manière intéressante, la quantité d'IL-12 administrée est cruciale. En effet, une dose trop faible ne permet pas de stimuler convenablement l'érythropoïèse alors qu'une dose trop élevée peut entraîner la mort des souris probablement en déclenchant une inflammation trop sévère (Orange *et al.*, 1995; Stevenson *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1998).

L'importance de l'IL-12 endogène a aussi été démontrée pendant les infections par *Plasmodium*. D'une part, la neutralisation de cette cytokine (Stevenson *et al.*, 1995) ou l'utilisation de souris IL-12p40<sup>-/-</sup> (Bastos *et al.*, 2002) ont démontré qu'en absence d'IL-12, la parasitémie était moins bien contrôlée et la production d'IFN- $\gamma$  ainsi que celle du NO étaient plus réduites. Cependant, le taux de survie des souris n'était pas affecté démontrant la possibilité de développer une immunité protectrice en absence de cette cytokine. D'autre part, une étude a démontré que le PbNK65 provoquait des infections létales associées à une expression importante de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12. La neutralisation de l'IL-12, ainsi que celle de l'IFN- $\gamma$ , ont permis de limiter la pathologie associée à l'infection sans toutefois affecter la parasitémie et le taux de survie des souris (Yoshimoto *et al.*, 1998). Ainsi, cette étude suggère qu'à forte concentration, l'IL-12 pourrait participer au développement de la pathologie associée aux infections par *Plasmodium* via l'induction d'IFN- $\gamma$  et probablement de TNF- $\alpha$  (Yoshimoto *et al.*, 1998).

En résumé, l'IL-12 semble jouer un rôle important dans le contrôle du parasite et du niveau d'anémie associé aux infections par *Plasmodium* (Angulo et Fresno, 2002). Pour ces raisons, il est important de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 rapportée chez les individus atteints de la malaria (Luty *et al.*, 2000; Perkins, Weinberg et Kremsner, 2000; Malaguarnera *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Impact de l'HE et de l'HZ sur la sécrétion d'IL-12 des MP

Pendant les infections par *Plasmodium*, les phagocytes (majoritairement les MP) ingèrent une quantité importante de composés ferriques (Nguyen *et al.*, 1995; Sherry *et al.*, 1995; Amodu *et al.*, 1998; Jaramillo *et al.*, 2009). Ces composés, dont l'HE et l'HZ, initialement contenus dans les GR vont être internalisés par les phagocytes suite à leur libération dans le sang ou suite à la phagocytose des GR abîmés ou parasités par le *Plasmodium* (Xu *et al.*, 2001; Chang et Stevenson, 2004). Bien que les études fonctionnelles chez les CD soient informatives, il est important de rappeler que les cellules interagissant le plus avec l'HZ (et vraisemblablement avec l'HE) sont les monocytes et les MP (Nguyen *et al.*, 1995; Sherry *et al.*, 1995; Amodu *et al.*, 1998; Jaramillo *et al.*, 2009). Ainsi, l'étude de l'impact de l'HZ et de l'HE sur les MP est plus appropriée dans le contexte des infections par *Plasmodium*. Le fer contenu dans l'HZ et l'HE est un oxydant puissant qui pourrait altérer le statut redox des MP et expliquer la production défectueuse de cette cytokine pendant les infections par *Plasmodium* (Xu *et al.*, 2001; Chaisavaneeyakorn *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2006).

La purification de l'HZ naturelle étant un processus complexe et fastidieux (Shio *et al.*, 2010), la majorité des études utilise de l'HZ synthétique (ou anhydride d'hématine). De plus, l'HZ étant une molécule amphiphile, elle a tendance à s'associer à de nombreuses molécules lors de sa formation dans les GR parasités (Shio *et al.*, 2010). De ce fait, l'emploi d'HZ synthétique permet de s'assurer que l'HZ est dépourvue de contaminants qui pourraient interférer avec la réalisation de l'étude. Bien que de nombreux protocoles décrivent la synthèse d'anhydride d'hématine à partir d'HE, seuls certains permettent d'obtenir un cristal de qualité (Jaramillo *et al.*, 2009; Shio *et al.*, 2010). Ainsi, il est envisageable que les résultats contrastants de certaines études reflètent en réalité la différence de qualité de l'HZ synthétique utilisée ou la présence de contaminants associés à l'HZ naturelle (Jaramillo *et al.*, 2009; Shio *et al.*, 2010). Jaramillo *et al.* ont démontré que la catalyse acide en phase aqueuse semble être la technique permettant d'obtenir les cristaux reflétant le plus fidèlement la taille et la structure de l'HZ naturelle (Jaramillo *et al.*, 2009; Shio *et al.*, 2010). La taille des cristaux influence directement la proportion des molécules d'HE présentes à la surface du cristal et capables d'interagir avec l'environnement. Les molécules d'HE à l'intérieur du

cristal sont très peu réactives. Ainsi, plus les cristaux sont grands moins l’HZ est réactive. Pour ces raisons, notre étude a utilisé l’HZ synthétique produite par cette méthode afin d’évaluer son impact sur la production d’IL-12 des MP. Cette HZ a été synthétisée dans le laboratoire du Pr. Martin Olivier (Université McGill).

### **1.3.2.1. Ingestion anormalement élevée d’HE et d’HZ par les MP pendant les infections par *Plasmodium***

Les infections par *Plasmodium* provoquent un stress oxydatif (Becker *et al.*, 2004) et une inflammation systémique (Awandare *et al.*, 2006) qui, associés au développement du parasite dans les GR, provoquent un vieillissement prématuré des GR parasités et non-parasités en fragilisant leur membrane (voir art. 1.4.4).

Vingt pourcents des GR abîmés par l’infection vont subir une hémolyse intravasculaire conduisant à la libération du leur contenu intracellulaire dont l’HZ et l’Hb dans le sang (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991). Lors des infections par *Plasmodium*, il a été estimé que la concentration d’Hb libre dans le sang varie entre 25 et 100  $\mu\text{M}$  (Sobolewski *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2009). Dans des conditions physiologiques normales, l’Hb libérée dans le sang est neutralisée en grande partie par l’haptoglobine (Hp) (Ferreira *et al.*, 2008). Le complexe Hb-Hp va ensuite être reconnu par le récepteur CD163 des MP déclenchant son internalisation. L’Hb non neutralisée par l’Hp va être oxydée en metHb et libérer l’hème ( $\text{Fe}^{2+}$  protoporphyrin IX) sous sa forme oxydée appelée HE ( $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin IX) (Ferreira *et al.*, 2008). Pendant les infections par *Plasmodium*, la concentration d’Hp plasmatique est quasiment nulle reflétant probablement l’élimination de nombreux complexes Hb/Hp par les MP suite à la lyse des GR abîmés (Ferreira *et al.*, 2008). Dans ce contexte, la majorité de l’Hb libérée est oxydée, ce qui entraîne la libération de quantités importantes d’HE. Certaines études menées chez la souris ont permis de déterminer que la concentration plasmatique d’HE pouvait atteindre jusqu’à 100  $\mu\text{M}$  (Arruda *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2009). Bien que l’HE libre puisse être neutralisée par l’hémopexine (Hx) ou l’albumine afin de favoriser son élimination via le récepteur CD91 des MP, il semblerait que, lors des infections par *Plasmodium*, ces mécanismes soient saturés puisqu’une accumulation d’HE libre est observable dans le sang (Ferreira *et al.*, 2008). La présence d’HE libre dans le plasma serait

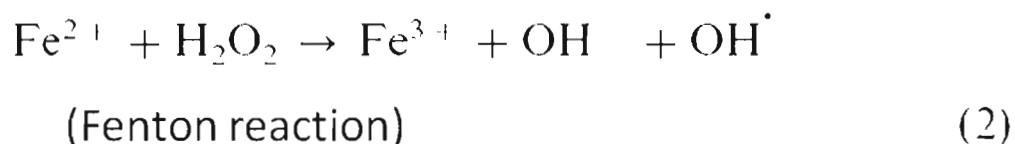
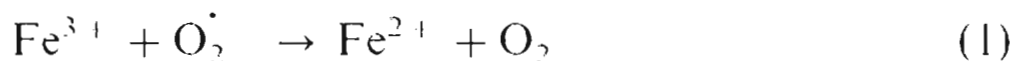
en partie responsable du vieillissement prématuré des GR non parasités (voir art. 1.4.4). De son côté, la concentration d'HZ rencontrée par les MP pendant les infections par *Plasmodium* a été évaluée entre 25 et 75  $\mu\text{M}$  (Orjih et Fitch, 1993; Sherry *et al.*, 1995; Sullivan, Ittarat et Meshnick, 1996; Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005).

Les 80% restants des GR abîmés vont être phagocytés par les MP au niveau du foie et de la rate principalement (Pranker, 1963; Loegering, Grover et Schneidkraut, 1984; Schroit *et al.*, 1984; Loegering *et al.*, 1987; Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Kiefer et Snyder, 2000; Mebius et Kraal, 2005; Saxena et Khandelwal, 2009) (voir art. 1.4.2). Ainsi, lors des infections par *Plasmodium*, les phagocytes rentrent en contact avec des quantités anormalement élevées de composés ferriques via l'acquisition de l'HE et de l'HZ libérées dans le sang mais aussi via la phagocytose de GR abîmés. Pendant les infections par *Plasmodium*, plusieurs études attestent de la présence d'HZ, de GR parasités et non-parasités dans les MP de divers organes dont ceux de la rate et du foie (Morakote et Justus, 1988; Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Turrini *et al.*, 1992; Sullivan, Ittarat et Meshnick, 1996; Schwarzer *et al.*, 1998; Skorokhod *et al.*, 2004).

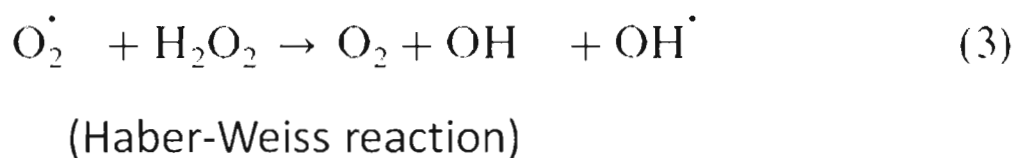
### 1.3.2.2. Pouvoir pro-oxydant de l'HE et de l'HZ

L'HZ et l'HE contiennent du fer, un élément capable de générer des ROS (pour « reactive oxygen species ») et d'engendrer un stress oxydatif chez la cellule (Gutteridge, 1986; Kehrer, 2000; Eaton et Qian, 2002; Goldstein *et al.*, 2003). Le couple oxydo-réducteur  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  induit la production d'ions hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) et de radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ) à partir de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et d'ions superoxydes ( $\text{O}_2^-$ ) selon la réaction de Haber-Weiss (Kehrer, 2000) (Fig. 1.8). Les  $\text{OH}^\cdot$  sont beaucoup plus instables que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et les  $\text{O}_2^-$  mais leur pouvoir oxydatif est bien plus important (Kohen et Nyska, 2002). Ces ROS sont capables d'induire la dégradation de l'ADN et des protéines ainsi que de provoquer la peroxydation des lipides membranaires (Kehrer, 2000).





The net reaction:



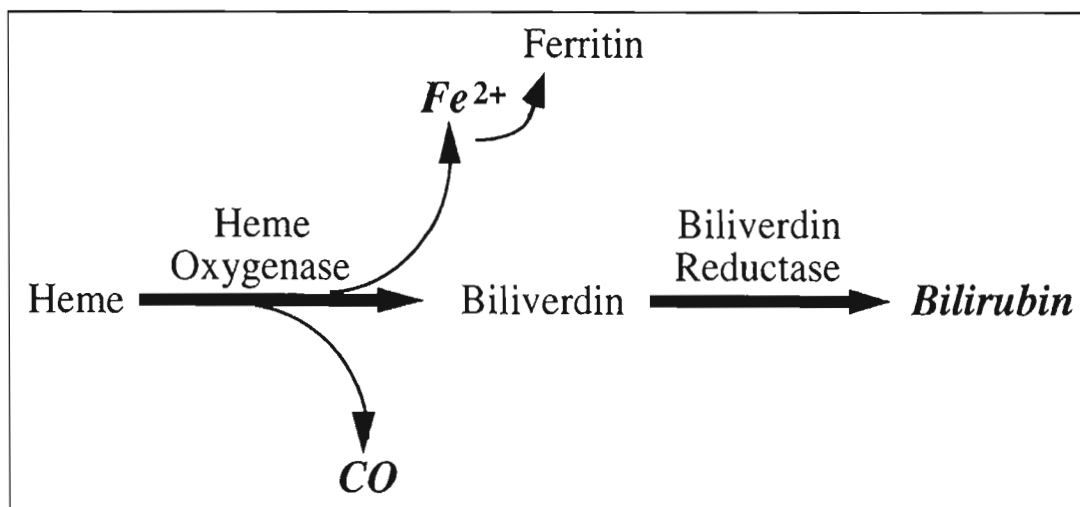
**Figure 1.8 : Réactions de Haber-Weiss**

Le couple oxydant-réducteur  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  induit des ROS capables d'interférer avec la signalisation intracellulaire et de causer des dégâts aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques composants la cellule. La réaction chimique conduisant à la production de ROS par le couple  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  a été étudiée en détail et nommée réaction d'Haber-Weiss d'après les noms de deux chercheurs l'ayant décomposée.

Source : (Kehrer, 2000)

Les MP sont responsables du recyclage du fer contenu dans l'HE des GR sénescents (Delaby *et al.*, 2005). Dans ce contexte, le fer de l'HE est libéré de manière enzymatique grâce à la HO-1 (Pimstone *et al.*, 1971; Otterbein et Choi, 2000; Knutson *et al.*, 2003) (Fig. 1.9) ou de manière non-enzymatique par les peroxydes (Gutteridge, 1986; Kremer, 1989). Du fait que l'HZ soit un biocristal d'HE, ce dernier n'est pas sensible à l'activité enzymatique de la HO-1. Ainsi, l'HZ n'est pas dégradée et peut persister pendant plusieurs mois à l'intérieur des MP (Schwarzer *et al.*, 1998; Levesque, Sullivan et Meshnick, 1999; Schwarzer *et al.*, 1999). Il a été estimé que seulement 3% du fer contenu dans l'HZ est labile (Schwarzer *et al.*, 1992). Plusieurs études menées avec des monocytes humains ou des MP murins ont démontré que l'acquisition de l'HZ et de l'HE induit la production de ROS et la peroxydation des lipides chez les phagocytes (Taramelli *et al.*, 1995; Schwarzer *et al.*, 1996; Taramelli *et al.*,

2000; Omodeo-Sale *et al.*, 2001; Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005). De manière intéressante, l'HE possède un pouvoir de peroxydation grandement supérieur à celui de l'HZ reflétant vraisemblablement le fait qu'une grande partie du fer de l'HZ soit non labile (Omodeo-Sale *et al.*, 2001).



**Figure 1.9 : Dégradation de l'hème par la hème oxygénase**

L'HE intracellulaire est dégradé par l'enzyme hème oxygénase, localisée au niveau du réticulum, qui dégrade l'HE en monoxyde de carbone, biliverdine et en fer. La biliverdine est ensuite transformée en bilirubine par la biliverdine réductase et le fer libre est complexé par la ferritine.

Source : (Otterbein et Choi, 2000)

### 1.3.2.3. Effets des composés ferriques sur les fonctions effectrices des phagocytes

#### Effets de l'HZ :

L'HZ a longtemps été considérée comme un composé inerte produit par le parasite dans le seul but de complexer l'HE libérée suite à la dégradation de l'Hb afin de la rendre non toxique. Cependant, depuis les 20 dernières années, de nombreuses études ont démontré que l'accumulation d'HZ entraîne la modification de diverses fonctions des phagocytes (Turrini, Schwarzer et Arese, 1993; Schwarzer *et al.*, 1998; Scorza *et al.*, 1999). Entre autre, l'HZ diminue la capacité des MP à présenter les antigènes aux cellules T (Morakote et Justus, 1988; Scorza *et al.*, 1999), inhibe la maturation des MP, des monocytes ainsi que des CD (Schwarzer *et al.*, 1998; Skorokhod *et al.*, 2004; Millington *et al.*, 2006) et pour finir inhibe la phagocytose et la flambée oxydative chez les monocytes (Schwarzer *et al.*, 1998).

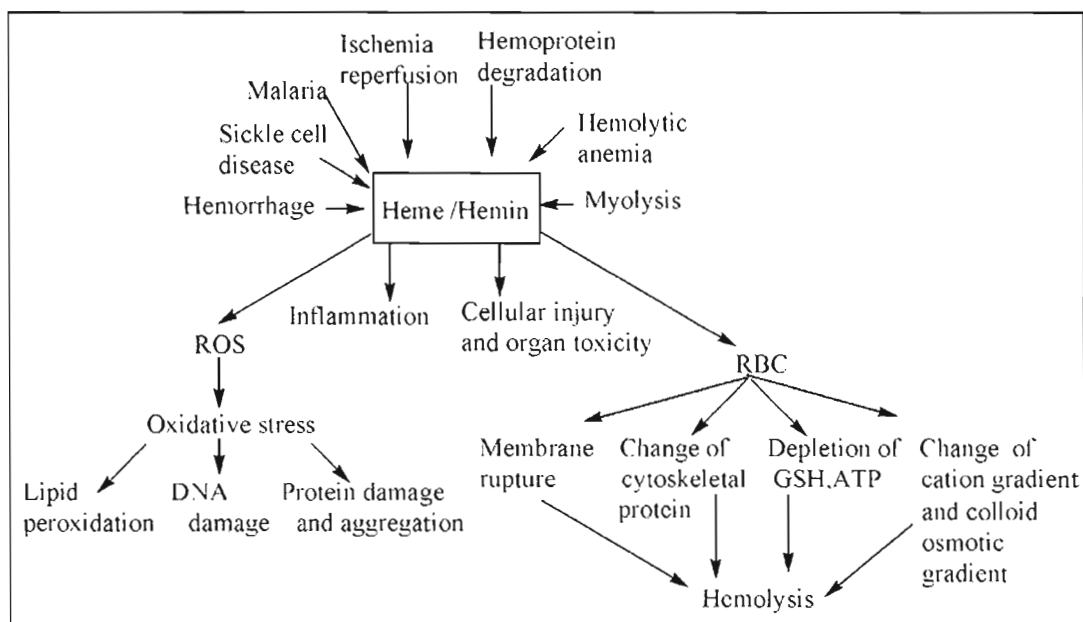
L'HZ est aussi capable de moduler la sécrétion de nombreux médiateurs chimiques par les phagocytes. En particulier, l'HZ est capable d'accroître la sécrétion de NO (Taramelli *et al.*, 1995; Prada *et al.*, 1996; Jaramillo *et al.*, 2003) et de diverses cytokines pro-inflammatoires (Sherry *et al.*, 1995; Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005) dont le TNF- $\alpha$  (Pichyangkul, Saengkrai et Webster, 1994; Prada *et al.*, 1995; Deshpande et Shastry, 2004; Nti *et al.*, 2005; Prato *et al.*, 2005) et l'IL-1 (Deshpande et Shastry, 2004; Jaramillo *et al.*, 2004; Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005; Shio *et al.*, 2009). Pour cette raison, l'HZ est suspectée d'être impliquée dans le développement de l'inflammation responsable de la pathologie associée aux infections par *Plasmodium* (Sherry *et al.*, 1995; Jaramillo *et al.*, 2004; Jaramillo *et al.*, 2009). A l'inverse, la sécrétion d'IL-12 en réponse au LPS ou à la phyto-hémagglutinine (PHA) est inhibée par l'HZ que ce soit chez les MP, les monocytes (Deshpande et Shastry, 2004; Keller *et al.*, 2006) ou les CD (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003; Millington *et al.*, 2006). Le mécanisme responsable de l'inhibition de l'IL-12 est mal connu et l'implication de l'IL-10 reste controversée (Ocana-Morgner, Mota et Rodriguez, 2003; Deshpande et Shastry, 2004; Keller *et al.*, 2006; Millington *et al.*, 2006). Ces observations *in vitro* sont soutenues par le fait que, lors des infections par *Plasmodium*, le degré d'anémie est inversement corrélé à la fois à la concentration d'IL-12 et au pourcentage de phagocytes contenant de l'HZ (Luty *et al.*, 2000; Casals-Pascual *et al.*, 2006;

Awandare *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent un lien entre la présence d’HZ dans les phagocytes et leur sécrétion défectueuse d’IL-12 *in vivo*. De manière intéressante, il semble que l’action immédiate de l’ingestion d’HZ et son accumulation aient des effets différents sur la physiologie des phagocytes (Shio *et al.*, 2010). Bien que l’HZ augmente la production de TNF- $\alpha$  lorsqu’elle est ajoutée simultanément avec le LPS, un prétraitement de 2 h avec ce même biocrystal inhibe la sécrétion de cette cytokine en réponse au LPS (Basilico *et al.*, 2003). De manière similaire, l’effet synergique de l’HZ sur la production de NO en réponse à l’IFN- $\gamma$  disparaît si le biocrystal est ajouté aux phagocytes plus de 6 h avant la stimulation (Taramelli *et al.*, 1995). Les ROS étant impliqués dans de nombreuses voies de signalisation, ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que, suite à son ingestion, l’HZ induit une production de ROS transitoire qui disparaît rapidement (Cambos *et al.*, 2010; Shio *et al.*, 2010).

#### Effets de l’HE :

L’HE libre induit la production de ROS et l’oxydation de divers composés cellulaires affectant ainsi la viabilité de nombreux types cellulaires (Bhoite-Solomon, Kessler-Ickson et Shaklai, 1993; Goldstein *et al.*, 2003; Wagener *et al.*, 2003; Gonzalez-Michaca *et al.*, 2004; Kumar et Bandyopadhyay, 2005; Ferreira *et al.*, 2008) (Fig. 1.10). De ce fait, divers mécanismes visent à réduire la quantité d’HE libre (Wagener *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2008). On peut notamment citer certaines protéines plasmatiques, dont l’Hp et l’albumine, qui forment des complexes avec l’HE libre afin de neutraliser ses propriétés oxydantes ou encore la HO-1 qui permet de métaboliser l’HE intracellulaire (Otterbein et Choi, 2000; Ferreira *et al.*, 2008). Dans des conditions physiologiques normales, ces mécanismes sont capables de neutraliser et de dégrader la totalité de l’HE libre. En revanche, diverses pathologies inflammatoires comme les insuffisances rénales aiguës, les lésions d’ischémie-reperfusion, l’athérosclérose et les maladies hémolytiques (dont la malaria présentée précédemment, la  $\beta$ -thalassémie et l’anémie falciforme) provoquent la libération de quantités importantes d’HE conduisant à la saturation des mécanismes cyto-protecteurs et à l’accumulation d’HE libre (Balla *et al.*, 2000; Wagener *et al.*, 2003; Kumar et Bandyopadhyay, 2005; Ferreira *et al.*, 2008). L’inflammation et le stress oxydatif associés à

l'HE libre sont vraisemblablement impliqués dans la pathologie de ces maladies (Nath *et al.*, 2001; Jeney *et al.*, 2002; Wagener *et al.*, 2003; Kumar et Bandyopadhyay, 2005).



**Figure 1.10: Les effets toxiques de l'HE**

Diverses pathologies inflammatoires entraînent une libération accrue d'HE. Une fois libérée, cette molécule contribue à l'inflammation et à l'altération de la membrane de GR conduisant à leur lyse prématurée. L'HE est aussi capable d'induire la production de ROS qui détériorent les protéines, les lipides et l'ADN des cellules avec lesquelles il entre en contact.

Source : (Kumar et Bandyopadhyay, 2005)

L'HE est une molécule pro-inflammatoire capable d'induire l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1 et P-sélectine entre autres) permettant de favoriser la migration des leucocytes au sein de divers organes dont le foie et la rate (Wagener *et al.*, 2001; Graca-Souza *et al.*, 2002). L'HE et les hémoprotéines sont aussi capables de moduler la sécrétion de cytokines de divers leucocytes. Ainsi, l'HE déclenche la flambée oxydative et induit la sécrétion d'IL-8 chez les neutrophiles alors que l'Hb active le NFκB et déclenche la sécrétion de la chimiokine MCP-1 (pour « monocyte chemotactic protein 1 ») chez les monocytes (Nath *et al.*, 2001). Enfin, l'HE induit la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α chez les MP sans toutefois affecter la sécrétion d'IL-12 et d'IL-6 (Figueiredo *et al.*, 2007). Il était largement accepté que les effets de l'HE reposaient exclusivement sur deux points. Tout d'abord, sur son pouvoir pro-oxydant lui permettait d'activer divers facteurs de transcription dont NFκB, AP-1 (pour « activator protein 1 ») et Sp1 (Balla *et al.*, 2000; Jeney *et al.*, 2002; Wagener *et al.*, 2003). Ensuite, sur sa capacité à s'insérer dans les membranes cellulaires et à provoquer l'altération de la fluidité membranaire et le fonctionnement des organelles ainsi que de la cellule (Schmitt, Frezzatti et Schreier, 1993; Wagener *et al.*, 2003). Cependant, Figueiredo *et al.* ont démontré que l'HE pouvait aussi agir en stimulant le TLR4 et en activant la voie Myd88 (pour « myeloid differentiation primary response gene 88 ») (Figueiredo *et al.*, 2007).

De manière intéressante et malgré les effets pro-inflammatoires énoncés précédemment, l'HE est capable de réduire la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α ainsi que d'augmenter la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoires IL-10 chez les monocytes et les MP stimulés par le LPS (Silver, Hamilton et Toossi, 1997; Yin *et al.*, 2004). De plus, l'HE inhibe la sécrétion de l'IL-1β et du TNF-α de monocytes stimulés avec des lipoprotéines de faible densité (ou LDL de l'anglais « low-density lipoprotein ») oxydés (Ma *et al.*, 2007).

Les infections par *Plasmodium* sont associées à une sécrétion faible d'IL-12 conduisant au développement d'une anémie sévère. L'inhibition de la sécrétion d'IL-12 pourrait être due à l'ingestion massive d'HZ et d'HE pendant les infections. La sécrétion d'IL-12 étant dépendante du statut redox de la cellule, il est possible que le pouvoir oxydant de ces composés soit capable d'affecter la production de cette cytokine par les MP durant les infections par *Plasmodium*. Afin de pouvoir améliorer la sécrétion d'IL-12 et de permettre de diminuer la pathologie associée aux infections par *Plasmodium*, il est important de déterminer si l'HZ et l'HE sont capable de moduler la sécrétion de cette cytokine et de mieux comprendre la manière dont elles affectent les MP.

## 1.4. Impact de l'érythrophagocytose sur la viabilité et la fonctionnalité des macrophages

L'organisme est composé de nombreux types cellulaires ayant des fonctions différentes et des durées de vie différentes. Alors que les neutrophiles sont éliminés après quelques jours seulement (Scheel-Toellner *et al.*, 2004), les GR humains restent fonctionnels pendant 120 jours (40 jours chez les rongeurs) (Bratosin *et al.*, 1998; Ishikawa-Sekigami *et al.*, 2006; Saxena et Khandelwal, 2009). Ainsi, l'organisme doit éliminer de manière continue un nombre important de cellules ayant atteint la fin de leur vie. Cette fonction est prise en charge par les MP du système réticulo-endothélial (de l'anglais « reticulo-endothelial system » ou RES). Dans des conditions physiologiques normales, les MP du RES éliminent une quantité relativement réduite de GR. En revanche, certaines pathologies hémolytiques, comme la malaria, occasionnent le vieillissement prématuré et l'élimination de quantités importantes de GR. Cette phagocytose accrue de GR pourrait être à l'origine de l'apoptose massive des MP décrite lors des infections par *Plasmodium* et contribuer au développement de l'immunosuppression.

### 1.4.1. Le système réticulo-endothélial

Le RES est composé majoritairement des monocytes du sang et des MP présents dans différents tissus dont le sang, la rate, le thymus, le foie, la moelle osseuse, la cavité péritonéale, les reins, les ganglions lymphatiques, la microglie, les poumons, le tractus intestinal, la peau et les tissus conjonctifs. A ces cellules s'ajoutent les CD des ganglions lymphatiques, de la peau et les cellules gliales du système nerveux central (Rous, 1923; Sacks, 1925; Wooles et Diluzio, 1963; Saba, 1970).

Le RES fait partie du système immunitaire et est impliqué dans la reconnaissance et la destruction des pathogènes du sang (Wooles et Diluzio, 1963; Loegering, Grover et Schneidkraut, 1984; Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Mebius et Kraal, 2005; Prommano *et al.*, 2005). En particulier, certaines études ont démontré l'importance capitale de la rate dans la résolution des infections par des bactéries ou des protozoaires (Garnham, 1970; Saba,



1970; Singer, 1973). En plus de cette fonction immunitaire, le RES est aussi responsable de l'élimination des cellules mortes de l'organisme comme décrit précédemment (Tanaka, 2005). Ce processus permet d'éviter que les cellules mortes libèrent leur contenu intracellulaire et déclenchent une inflammation inutile, voire dangereuse (Tanaka, 2005). Dans ce contexte, les MP du RES éliminent de manière continue les GR sénescents du sang (Sacks, ; Knutson *et al.*, 2003; Chang et Stevenson, 2004).

#### **1.4.2. Élimination des globules rouges sénescents par la rate**

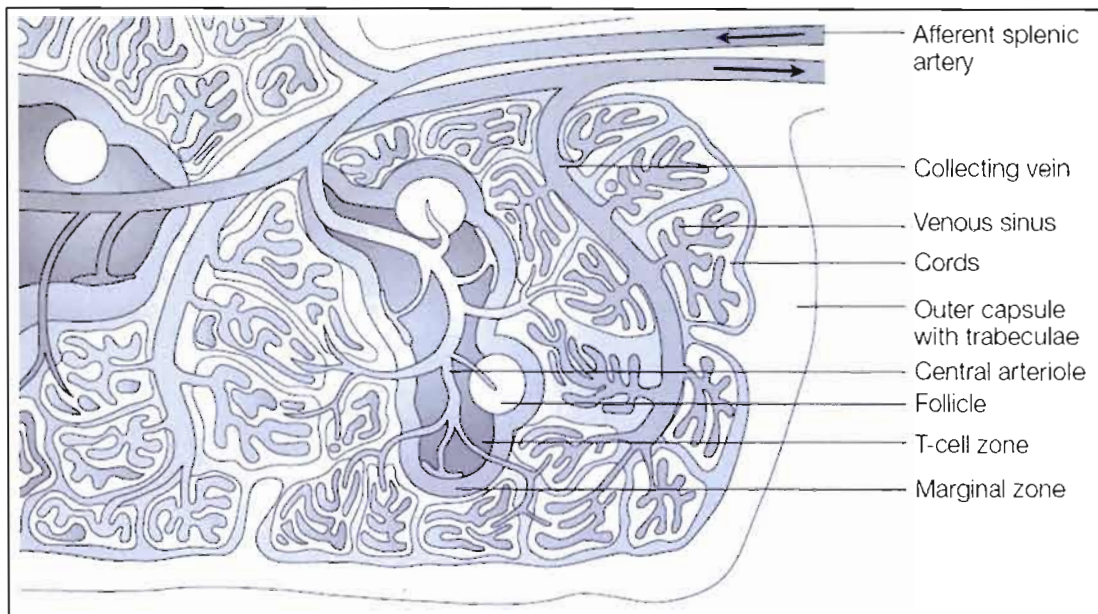
Au terme de leur maturation, les GR voient leur noyau disparaître. De ce fait, les GR sont sensibles aux insultes de leur environnement et accumulent des altérations puisqu'ils sont incapables d'induire l'expression d'enzymes impliquées dans les mécanismes de protection ou de réparation (Saxena et Khandelwal, 2009). Dans des conditions physiologiques normales, ce sont les cycles répétés d'oxydation/réduction de l'Hb (suite à la fixation de l'oxygène au poumon et à sa libération dans les tissus) ainsi que la dégradation progressive de l'Hb qui sont responsables en grande partie de la détérioration des GR. Ces phénomènes provoquent un stress oxydatif chez les GR qui entraîne des modifications au niveau de leur membrane et conduit à leur sénescence (Chiu, Kuypers et Lubin, 1989; Chiu et Lubin, 1989; Kiefer et Snyder, 2000; Saxena et Khandelwal, 2009).

Quatre-vingt pourcents des GR sénescents sont éliminés de manière extravasculaire par les MP du RES (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991). Les 20% restants éclatent directement dans la circulation sanguine (élimination intravasculaire) et leur contenu est éliminé par les reins et les MP du RES (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991). L'élimination extravasculaire des GR sénescents est effectuée en grande partie par les MP de la rate, du foie (cellules de Kupffer) et de la moelle osseuse (Pranker, 1963; Bennett et Kay, 1981; Loegering, Grover et Schneidkraut, 1984; Schroit *et al.*, 1984; Loegering *et al.*, 1987; Kiefer et Snyder, 2000; Mebius et Kraal, 2005; Saxena et Khandelwal, 2009). Plusieurs études démontrent que la rate joue un rôle prédominant par rapport aux deux autres organes (Pimstone *et al.*, 1971; Schroit *et al.*, 1984; Prommano *et al.*, 2005; Ishikawa-Sekigami *et al.*, 2006).

#### 1.4.2.1. La rate : un organe adapté à la filtration du sang

Le sang est apporté à la rate par l'artère liénale qui va se ramifier et donner les artères trabéculaires puis les artères centrales qui traversent la pulpe blanche de la rate (Fig. 1.11). Cette zone, très riche en cellules T et B, possède une architecture similaire à celle des ganglions lymphatiques et constitue un site privilégié du développement de la réponse immunitaire adaptative (Mebius et Kraal, 2005; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). Certaines artères centrales (environ 10%) vont se diriger directement dans la zone marginale de la rate alors que d'autres vont devenir les artères pénicillées puis les capillaires à housse et apporter le sang dans la pulpe rouge de la rate (Mebius et Kraal, 2005; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). Les capillaires à housse sont bouchés à leur extrémité, ce qui va forcer les cellules sanguines à passer entre les cellules endothéliales afin de rejoindre le parenchyme de la rate. Cette zone est riche en MP et possède un hémocrite élevé (60%) ayant pour effet de ralentir le débit sanguin. Ces conditions favorisent la reconnaissance et l'élimination des pathogènes sanguins et des GR abîmés/sénescents par les MP (étape de filtration du sang) (Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009).

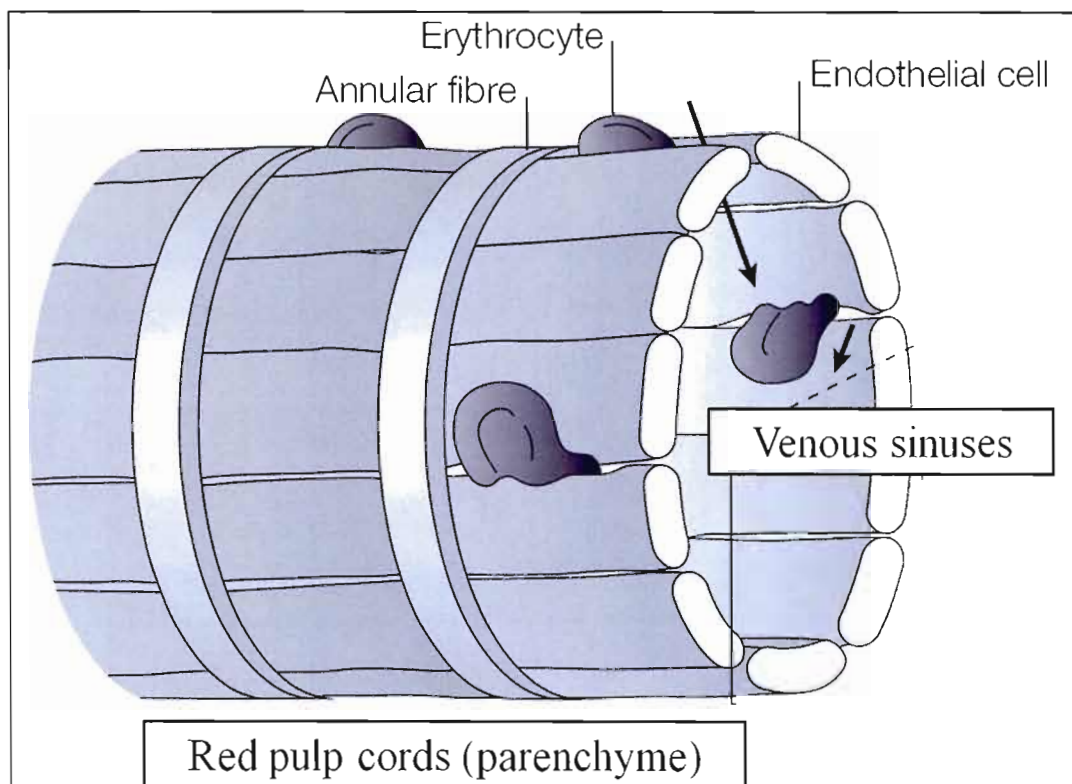
Le sang va ensuite être collecté dans les sinus veineux. Afin d'entrer dans le sinus veineux et de rejoindre la circulation sanguine, les cellules sanguines vont devoir passer entre les cellules endothéliales du sinus où elles sont de nouveau inspectées par les MP sinusoidaux (Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009) (Fig. 1.12). Les GR sénescents, du fait de leur déformabilité réduite et de leur importante opsonisation (anticorps et complément), vont rester piégés dans le parenchyme (Mebius et Kraal, 2005). La pulpe rouge de la rate est composée du parenchyme et de sinus veineux et représente 80% du volume total de la rate (Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). De manière intéressante, 10% du flot sanguin passent directement des artères centrales aux sinus veineux sans passer par le parenchyme évitant ainsi l'étape de filtration.



**Figure 1.11 : Schématisation de l'architecture de la rate**

Structure générale de la rate montrant son irrigation sanguine et sa compartimentation. On observe la pulpe blanche (« T cell zone » et « follicule ») où la réponse immunitaire adaptative est induite et la pulpe rouge (« cords » et « venous sinus ») où les GR sénescents et abîmés sont éliminés par les MP du RES.

*Source : (Mebius et Kraal, 2005)*



**Figure 1.12 : Schématisation du passage des cellules sanguines du parenchyme vers le sinus veineux**

Après avoir été filtrés par les MP du parenchyme de la rate, les GR du sang entrent dans le sinus veineux afin de rejoindre la circulation sanguine périphérique. Lors de ce processus, les cellules sanguines passent entre les cellules endothéliales du sinus où elles sont inspectées par les MP sinusoïdaux.

*Source : (Mebius et Kraal, 2005)*

#### 1.4.2.2. Reconnaissance des globules rouges sénescents par les macrophages

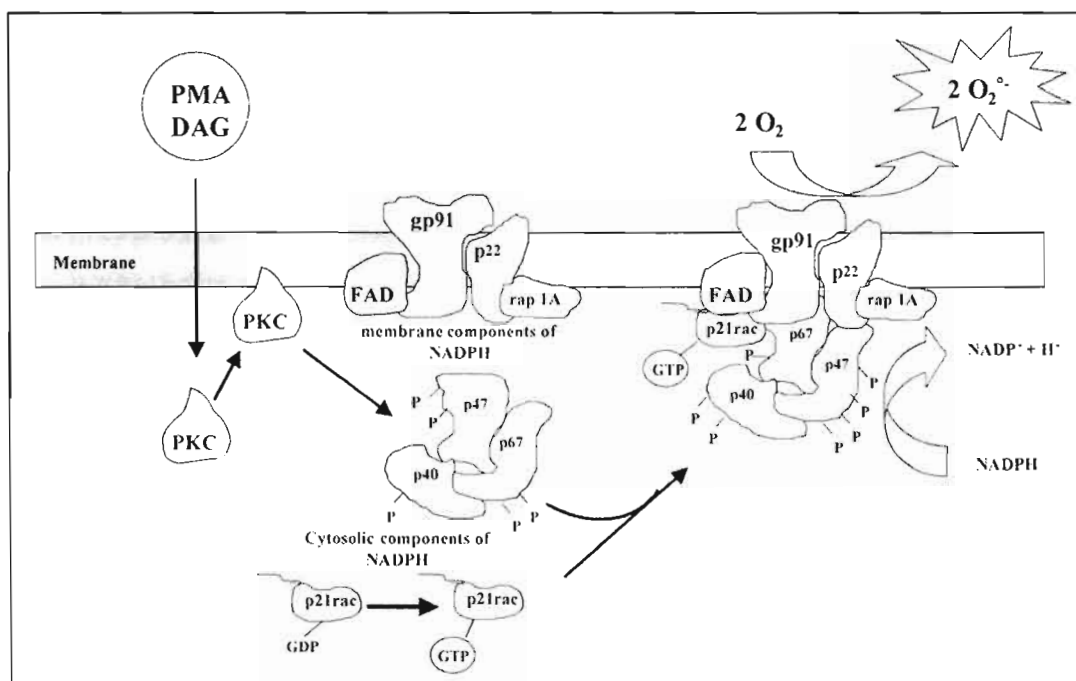
Comme décrit précédemment, les cycles d'oxydation/réduction répétés de l'Hb provoquent la détérioration progressive de la membrane des GR (Kiefer et Snyder, 2000; Saxena et Khandelwal, 2009). La membrane des GR sénescents présente de nombreuses modifications permettant leur reconnaissance par les MP du RES (Bennett et Kay, 1981; Bratosin *et al.*, 1998). Tout d'abord, au fur et à mesure de leur vieillissement, les GR perdent les résidus d'acide sialique (désialysation) dévoilant progressivement les résidus  $\beta$ -galactosyle capables de déclencher l'érythrophagocytose. Ensuite, les protéines et les lipides membranaires présentent des signes de dénaturation ou d'oxydation entraînant l'agrégation de certains composants membranaires dont la protéine Band-3 (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Bratosin *et al.*, 1998). Les protéines ainsi associées vont être la cible d'auto-anticorps et éventuellement du système du complément qui seront reconnus respectivement par les FcR et les récepteurs du complément des MP. De leur côté, les lipides oxydés pourraient être reconnus par le récepteur CD36 des phagocytes (Kiefer et Snyder, 2000). En parallèle, les GR perdent leur asymétrie membranaire et présentent des résidus phosphatidylsérine sur la face externe de leur membrane déclenchant ainsi leur reconnaissance par le récepteur CD36 des MP (Kiefer et Snyder, 2000).

En complément de toutes ces modifications favorisant la reconnaissance par les MP, les GR sénescents perdent progressivement leur forme de discocyte pour devenir des sphérocytes ayant une déformabilité réduite et favorisant leur rétention au niveau du parenchyme de la pulpe rouge de la rate (Mebius et Kraal, 2005). De plus, l'expression des marqueurs CD47 et CD147, responsables respectivement de l'inhibition de la phagocytose des MP et de la facilitation de la sortie de la rate des GR, diminue à la surface des GR sénescents (Ishikawa-Sekigami *et al.*, 2006; Saxena et Khandelwal, 2009). Ces changements ont pour effet d'augmenter le temps de séjour des GR sénescents au niveau de la rate et de favoriser leur phagocytose par les MP.

### 1.4.2.3. Dégradation des globules rouges sénescents par les macrophages

Une fois reconnus par les MP, les GR sénescents sont phagocytés. Leur reconnaissance via les FcR va induire la flambée oxydative chez le MP, ce qui va favoriser la destruction des GR et la dégradation de l'Hb (Yamamoto et Johnston, 1984; Clerget et Polla, 1990; Kamen *et al.*, 2008). Cette flambée oxydative résulte de l'activation de l'enzyme NADPH oxydase qui catalyse le transfert des électrons du NADPH aux molécules d'oxygène à l'origine de la formation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Vignais, 2002) (Fig. 1.13). En absence de stimulation, certaines sous-unités composant la NADPH oxydase se retrouvent dans le cytoplasme alors que les autres sont associées à la membrane. Suite à l'activation des phagocytes, toutes les sous-unités vont s'assembler et s'associer à la membrane afin de former l'enzyme active selon des processus dépendants et indépendants de la protéine kinase C (PKC) (DeLeo *et al.*, 1999; Morena *et al.*, 2002; Vignais, 2002) (Fig. 1.13).

Dans le phagosome, les GR vont être dégradés de manière enzymatique (Knutson *et al.*, 2003; Mebius et Kraal, 2005). L'Hb va être oxydée et subir une dégradation protéolytique, ce qui va libérer une quantité équimolaire de ROS (Misra et Fridovich, 1972; Chiu et Lubin, 1989; Huang *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 2003) et conduire à la libération de l'hème (Fe<sup>+2</sup> protoporphyrine IX) sous sa forme oxydée l'HE (Fe<sup>+3</sup> protoporphyrine IX) (Bunn et Jandl, 1968; Chiu et Lubin, 1989; Francis, Sullivan et Goldberg, 1997; Knutson *et al.*, 2003; Greer *et al.*, 2008). L'HE va ensuite rejoindre le cytoplasme pour être transformée en fer, biliverdine et monoxyde de carbone (CO) par la HO-1 associée au réticulum endoplasmique (Pimstone *et al.*, 1971; Otterbein et Choi, 2000; Knutson *et al.*, 2003). Le fer peut aussi être libéré par la dégradation non-enzymatique de l'HE par les peroxydes (Gutteridge, 1986; Kremer, 1989). Ensuite, le fer libre sera stocké suite à sa neutralisation par la ferritine ou excrété via des fer-ATPases ou la ferroportine (Otterbein et Choi, 2000; Delaby *et al.*, 2005; Mebius et Kraal, 2005; Soe-Lin *et al.*, 2009).



**Figure 1.13 : Activation de la NADPH oxydase et production d'ions superoxydes**

La NADPH oxydase est l'une des principales sources de ROS intracellulaires. Ce complexe enzymatique est composé de plusieurs sous unités qui sont dispersées dans le cytoplasme et la membrane plasmique de la cellule en absence de stimulation. Suite à la stimulation, ces unités vont s'associer au niveau de la membrane et permettre la conversion du dioxygène en ions superoxydes.

Source : (Morena et al., 2002)

Une étude menée *in vitro* a permis de montrer que la reconnaissance et la phagocytose des GR sénescents/abîmés commence après quelques minutes d'incubation et s'échelonne sur 2 h (Gemsa et al., 1973). Suite à l'érythrophagocytose, les GR phagocytés sont observables dans les phagolysosomes sous forme de structures denses et rondes qui vont progressivement s'atténuer jusqu'à disparaître complètement après 5-7 h d'incubation. Quarante minutes après le début de l'érythrophagocytose, les MP commencent à excréter le fer provenant des GR (Fillet, Beguin et Baldelli, 1989). Ce délai correspond vraisemblablement au temps nécessaire à la destruction des GR et à la digestion de l'HE par la HO-1. Bien que les MP



présentent une activité HO basale, l'activité de cette enzyme est fortement accrue suite à l'érythrophagocytose (Gemsal *et al.*, 1973). Ainsi, 3-5 h après l'ingestion des GR, l'activité de la HO est multipliée par 10 pour ensuite atteindre un plateau (Gemsal *et al.*, 1973). Des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'excrétion du fer des GR se passe en deux étapes (Fillet, Cook et Finch, 1974; Kondo *et al.*, 1988; Fillet, Beguin et Baldelli, 1989; Delaby *et al.*, 2005). Dans les premières heures suivant l'érythrophagocytose, les MP excrètent rapidement les deux tiers du fer provenant des GR ( $t_{1/2} = 34$  minutes). La quantité restante du fer est ensuite stockée dans les MP et va être excrétée de manière beaucoup plus lente ( $t_{1/2} = 6$  jours). La transition entre les deux étapes est caractérisée par une diminution de l'expression de la ferroportine suivie d'une augmentation de la ferritine intracellulaire (Delaby *et al.*, 2005).

De manière intéressante, l'HE peut jouer un rôle cytoprotecteur ou avoir un effet toxique dépendamment de la concentration à laquelle elle est rencontrée dans les cellules et/ou les tissus (Kumar et Bandyopadhyay, 2005). En faible quantité, l'HE active la HO-1 et sa dégradation conduit à la production de CO, de biliverdine et de fer ainsi qu'à l'induction de l'expression de la ferritine. Dans ces conditions, le pouvoir antioxydant du CO et de la biliverdine ainsi que la neutralisation du fer par la ferritine jouent un rôle protecteur pour la cellule (Hayashi *et al.*, 1999; Kumar et Bandyopadhyay, 2005). En revanche, en quantité importante, l'inflammation et le stress oxydative induit par l'HE deviennent trop importants pour être compensés par les effets cytoprotecteurs de la HO-1, du CO, de la biliverdine ou de la ferritine mettant ainsi en péril l'intégrité et la survie de la cellule (Nath *et al.*, 2001; Wagener *et al.*, 2001). Dans ce contexte, il a été démontré que l'HE est toxique pour de nombreux types cellulaires et peut induire la mort cellulaire en agissant selon des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs (Balla *et al.*, 1992; Bhoite-Solomon, Kessler-Icekson et Shaklai, 1993; Braverman, Helson et Helson, 1995; da Silva *et al.*, 1996; Kumar et Bandyopadhyay, 2005). En effet, ce composé est capable de provoquer la peroxydation des lipides membranaires (O'Brien et Little, 1969) mais aussi d'induire une lyse osmotique des cellules (Hebbel et Eaton, 1989). De son côté, le fer libéré suite à la dégradation de l'HE est capable de produire des OH<sup>-</sup> via la réaction de Haber-Weiss (Gutteridge, 1986; Eaton et Qian, 2002; Goldstein *et al.*, 2003) (Fig. 1.8) et d'entraîner la peroxydation des lipides et la



dégradation de l'ADN. Le fer contenu dans l'HE peut passer de l'état ferrique (+III) à l'état ferreux (+II) causant ainsi l'oxydation des composés à proximité (Holt et Moore, 2000).

Ainsi, que ce soit par l'activation de la NADPH oxydase, par l'oxydation de l'Hb ou par la libération de l'HE et du fer, la dégradation des GR entraîne un stress oxydatif au sein du MP.

#### **1.4.3. Impact de l'érythrophagocytose sur les fonctions effectrices des macrophages**

Connaissant l'importance des MP du RES tant au niveau de la réponse immunitaire qu'au niveau de l'élimination des cellules mortes, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées afin d'évaluer l'effet de l'érythrophagocytose sur les capacités phagocytaires et antibactériennes des MP.

Les premières études portant sur le sujet ont évalué l'impact d'une injection systémique de GR opsonisés avec des IgG (GR IgG) (Hand et King-Thompson, 1983; Loegering *et al.*, 1987; Commins, Loegering et Gudewicz, 1990) sur les MP du RES chez le rat. Les GR IgG sont reconnus comme des GR sénescents, ce qui permet d'accroître l'intensité de l'érythrophagocytose *in vivo* (Loegering *et al.*, 1987). Après leur injection, la grande majorité des GR IgG se retrouve rapidement phagocytée par les MP de la rate (après 3 h) et du foie (après 0.5 h). Alors que, chez les rats témoins présentant une érythrophagocytose basale, les MP du RES sont parfaitement fonctionnels, les MP des rats ayant reçu l'injection de GR IgG présentent une capacité phagocytaire réduite. Suite à cette injection, les MP du RES possèdent une capacité réduite à internaliser les bactéries entraînant une sensibilité accrue aux infections par *Pseudomonas aeruginosa* (Loegering *et al.*, 1987).

Ces observations *in vivo* ont été corroborées *in vitro* avec différents modèles. Hand *et al.* ont démontré que des MP péritonéaux et alvéolaires préalablement traités avec des GR IgG présentaient une activité antibactérienne diminuée contre *Salmonella* et *Staphylococcus* respectivement. Ce phénomène était associé avec une capacité limitée des MP à produire des ROS (Gill, Kaye et Hook, 1966; Hand et King-Thompson, 1983). Deux autres études utilisant des MP péritonéaux ont aussi montré que la phagocytose préalable de GR IgG causait la

peroxydation des lipides membranaires des phagocytes, une inhibition de la phagocytose et une réduction de la flambée oxydative en réponse au phorbol myristate acétate (PMA) (Commins, Loegering et Gudewicz, 1990; Loegering *et al.*, 1996).

Ces expériences démontrent que, dans des conditions normales, l'érythrophagocytose basale ne semble pas affecter de manière significative les fonctions effectrices des MP du RES (Loegering *et al.*, 1987). En revanche, en augmentant l'intensité de l'érythrophagocytose par l'ajout de GR IgG, il semble que la phagocytose de GR cause des dysfonctions diverses aux MP (résumé dans (Loegering *et al.*, 1996)).

#### **1.4.4. Maladies associées à une proportion anormalement élevée de GR sénescents**

Chez un individu en bonne santé, les GR sénescents représentent seulement 1% (2% chez les rongeurs) des GR totaux (Saxena et Khandelwal, 2009). Des facteurs externes, comme des agents oxydants (Lutz *et al.*, 1988; Schwarzer *et al.*, 1992), certaines infections (Ronai, Avraham et Sulitzeanu, 1981; Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Turrini *et al.*, 1992; Atamna et Ginsburg, 1993; Das et Nanda, 1999; Dondorp *et al.*, 1999; Omodeo-Sale *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Chang et Stevenson, 2004; Omodeo-Sale *et al.*, 2005; Weiss et Goodnough, 2005) ou certaines maladies héréditaires affectant l'Hb (Schroit *et al.*, 1984; Hebbel, 1991; Shalev *et al.*, 1995; Browne *et al.*, 1997; Browne, Shalev et Hebbel, 1998; Dondorp *et al.*, 1999; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009), peuvent accélérer la détérioration de la membrane des GR et entraîner leur vieillissement prématuré. Dans ces conditions, la proportion de GR sénescents augmente fortement, occasionnant une érythrophagocytose accrue reflétée par la présence de nombreux GR à l'intérieur des phagocytes du RES (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Hebbel, 1991; Schwarzer *et al.*, 1992; Turrini *et al.*, 1992). Ces pathologies sont associées à une splénomégalie résultant de l'élimination accrue de GR au niveau de la rate.

L'anémie falciforme et la thalassémie sont des maladies héréditaires affectant l'Hb. Les patients affectés par l'anémie falciforme possèdent une Hb anormale qui polymérise dans des conditions de faible oxygénation, ce qui peut entraîner sa précipitation (Becker *et al.*, 2004; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). Cette polymérisation est responsable de la forme en

faucille des GR ainsi que de leur faible déformabilité (Hebbel, 1991; Becker *et al.*, 2004; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). De leur côté, les patients atteints par la thalassémie ont une production défectueuse de l'une des sous-unités de l'Hb entraînant un fort pourcentage de sous-unités non-appariées ayant tendance à précipiter (Becker *et al.*, 2004). Ces deux pathologies sont associées à des dépôts anormalement élevés d'hémichrome (Hb précipitée), d'HE libre et de fer au niveau de la membrane des GR. Ces dépôts sont responsables de diverses modifications oxydatives, dont la peroxydation des lipides et l'agrégation de certaines protéines membranaires (Browne, Shalev et Hebbel, 1998), affectant la membrane des GR et réduisant leur espérance de vie (Hebbel, 1991; Shalev *et al.*, 1995; Browne *et al.*, 1997; Browne, Shalev et Hebbel, 1998; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009).

Les infections par *Plasmodium* provoquent elles aussi un vieillissement prématuré des GR (Chang et Stevenson, 2004). Le développement du parasite au sein du GR, et plus particulièrement la digestion de l'Hb et la libération de l'HE induisent la production de ROS dont le  $H_2O_2$  et les  $OH^\cdot$  (Atamna et Ginsburg, 1993; Becker *et al.*, 2004). En plus de ce stress oxydatif, les GR parasités présentent des dépôts d'HE semblables à ceux observés chez les patients atteints de l'anémie falciforme et de la thalassémie au niveau de leur membrane (Becker *et al.*, 2004). Ces deux phénomènes entraînent l'oxydation de la membrane des GR (Das et Nanda, 1999; Omodeo-Sale *et al.*, 2003). De manière surprenante, il a été rapporté que les GR non parasités présentent eux aussi un vieillissement prématuré pendant les infections par *Plasmodium* (Pongponratn *et al.*, 1987; Schwarzer *et al.*, 1992; Dondorp *et al.*, 1999; Omodeo-Sale *et al.*, 2003). Ainsi, il a été estimé que 8.5 GR non parasités sont phagocytés pour chaque GR parasité (Jakeman *et al.*, 1999; Chang et Stevenson, 2004). Il semblerait que la libération de ROS extracellulaires suite à l'activation des MP ainsi que le stress oxydatif associé au développement du parasite dans les GR parasités soient à l'origine du vieillissement prématuré des GR non parasités pendant la malaria (Clark, Chaudhri et Cowden, 1989; Schwarzer *et al.*, 1992; Omodeo-Sale *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Ndungu *et al.*, 2005). Il est aussi envisageable que l'HE ou l'Hb libérées dans le sang suite à la lyse des GR parasités puissent s'associer à la membrane des GR non parasités et provoquer leur peroxydation (Omodeo-Sale *et al.*, 2005) (voir par. 1.3.2.1).

De leur côté, les agents oxydants vont provoquer l'oxydation des lipides membranaires, l'externalisation des résidus phosphatidylsérine et induire l'agrégation des protéines membranaires des GR dont la protéine Band-3 (Lutz *et al.*, 1988; Mandal *et al.*, 2002).

Que ce soit le vieillissement prématuré des GR induit par les oxydants, l'anémie falciforme, la thalassémie ou la malaria, il semble que cela aboutisse à des modifications membranaires très similaires à celles observées chez les GR sénescents (voir par. 1.4.2.2). Ainsi, ces pathologies sont associées à une agrégation prononcée de la protéine Band-3, l'oxydation des lipides membranaires, l'exposition des résidus phosphatidylsérine, l'opsonisation avec des anticorps et une diminution de la déformabilité des GR (Ronai *et al.*, 1981; Schroit *et al.*, 1984; Arese *et al.*, 1991; Hebbel, 1991; Turrini *et al.*, 1992; Browne *et al.*, 1997; Browne *et al.*, 1998; Dondorp *et al.*, 1999a; Dondorp *et al.*, 1999b; Omodeo-Sale *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Chang and Stevenson, 2004). De ce fait, l'élimination de ces GR utilise des mécanismes très semblables à ceux impliqués dans la reconnaissance et la destruction des GR sénescents.

#### **1.4.5. Dysfonctions et apoptose des macrophages pendant la malaria**

Comme décrit à l'instant, les infections par *Plasmodium* causent une érythrophagocytose importante par les MP du RES (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Schwarzer *et al.*, 1992). Plusieurs études rapportent que diverses fonctions effectrices des MP comme la capacité à stimuler une réponse humorale, la phagocytose, l'ADCC ou encore l'activation de la NADPH oxydase sont affectées pendant la malaria (résumé dans (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991)). En 1992, Schwarzer *et al.* ont démontré *in vitro* que la phagocytose préalable de GR parasités par le *Plasmodium* était capable d'inhiber la phagocytose et l'activation de la NADPH oxydase suggérant que les dysfonctions observées chez les MP *in vivo* pourraient être directement liées à l'érythrophagocytose importante causée par la malaria (Schwarzer *et al.*, 1992). Une étude ayant évalué l'ADCC des MP au cours de l'infection tend à supporter cette théorie en démontrant que la dysfonction des MP

semble plus marquée au pic de l'infection correspondant au moment où l'érythrophagocytose est vraisemblablement la plus importante (Shear, 1988).

Ces résultats suggèrent que certaines pathologies, dont la malaria, provoquent une phagocytose de GR suffisamment importante pour affecter les fonctions des MP de manière similaire à ce qui avait été précédemment décrit en utilisant une exacerbation artificielle de l'érythrophagocytose via l'injection systémique de GR IgG (Loefering *et al.*, 1987).

Les infections par *Plasmodium* provoquent aussi l'apoptose d'un nombre important des MP (Helmbj, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). Cette étude montre que, pendant la malaria, le nombre de MP apoptotiques au niveau de la rate augmente fortement au fur et à mesure que le nombre de GR parasités augmente. Il est tentant de spéculer qu'une érythrophagocytose importante et soutenue pendant plusieurs jours consécutifs pourrait affecter la viabilité des MP. Les études précédemment réalisées *in vitro* sur l'érythrophagocytose et utilisant des GR IgG (Loefering *et al.*, 1996) ou des GR parasités par le *Plasmodium* (Schwarzer *et al.*, 1992) n'ont rapporté aucune diminution de la viabilité des MP. Cependant, ces études utilisaient des temps d'incubation relativement courts (1 à 2 h) ne permettant la phagocytose que d'un nombre restreint de GR (5 à 10 GR au total). Par conséquent, il est possible qu'une ingestion plus prononcée et plus soutenue dans le temps de GR puisse occasionner une perte de viabilité des MP. Le troisième axe de recherche de ce projet de thèse visera à étudier ce phénomène (voir chap. 4).

**CHAPITRE II**  
**NATURAL REGULATORY T CELLS**  
**(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) CONTROL THE PRODUCTION OF**  
**PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES DURING**  
***PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI* INFECTION AND**  
**DO NOT CONTRIBUTE TO IMMUNE EVASION**

*M. Cambos<sup>a</sup>, B. Bélanger<sup>a</sup>, A. Jacques<sup>a</sup>, A. Roulet<sup>b</sup> and T. Scorza<sup>a,c</sup>*

*<sup>a</sup>Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Canada.*

*<sup>b</sup>Institute of Parasitology, McGill University, Ste-Anne- de Bellevue, Canada.*

*<sup>c</sup>FQRNT Centre for Host-Parasite Interactions*

Ce chapitre, présenté sous forme d'article scientifique, a été accepté pour publication dans la revue « International Journal for Parasitology » le 16 juillet 2007 et a nécessité l'implication de plusieurs personnes. L'infection des souris, la récupération des divers organes ainsi que la purification des divers types cellulaires employés dans cette étude ont été réalisées par le Pr. T Scorza et l'auteur de cette thèse (M. Cambos). Le dosage des diverses cytokines pro- et anti-inflammatoires a été effectué essentiellement par M. Cambos avec l'aide de A. Jacques pour certaines analyses. La purification et l'administration de l'anticorps anti-CD25 ainsi que le phénotypage des cellules T régulatrices *in vivo* ont été réalisés par M. Cambos. La concentration d'Hb sanguine a été déterminée par B. Bélanger. La rédaction du manuscrit a été réalisée par le Pr. T. Scorza en concertation avec M. Cambos. Le Pr. T. Scorza a aussi contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant le support financier nécessaire ainsi que son expertise scientifique avisée. Pour des raisons écologiques et d'économie de papier, les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

## 2.1. ABSTRACT

Different functions have been attributed to natural regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (TregN) cells during malaria infection. Herein, we assessed the role for TregN cells during infections with lethal (DS) and non-lethal (DK) *Pca* parasites, comparing the levels of parasitemia, inflammation and anaemia. Independent of parasite virulence, the population of splenic TregN cells expanded during infection, and the absolute numbers of activated CD69<sup>+</sup> TregN cells were higher in DS-infected mice. *In vivo* depletion of CD25<sup>+</sup> T cells, which eliminated 80% of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and 60–70% of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells, significantly decreased the number of CD69<sup>+</sup> TregN cells in mice with lethal malaria. As a result, higher parasite burden and morbidity were measured in the latter, whereas the kinetics of infection with non-lethal parasites remained unaffected. In the absence of TregN cells, parasite-specific IFN- $\gamma$  responses by CD4<sup>+</sup> T cells increased significantly, both in mice with lethal and non-lethal infections, whereas IL-2 production was only stimulated in mice with non-lethal malaria. Following the depletion of CD25<sup>+</sup> T cells, the production of IL-10 by CD90<sup>+</sup> cells was also enhanced in infected mice. Interestingly, a potent induction of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> and CD90<sup>+</sup> splenocytes was measured in DS-infected mice, which also suffered severe anaemia earlier than non-depleted infected controls. Taken together, our data suggest that the expansion and activation of TregN cells represent a counter-regulatory response to the overwhelming inflammation associated with lethal *Pca*. This response to infection involves Th1 lymphocytes as well as cells from the innate immune system.

**Keywords:** Rodent malaria; *Plasmodium* virulence; Natural regulatory T cells; Inflammation.



## 2.2. INTRODUCTION

TregN cells represent a population of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> T cells constitutively expressing the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor (CD25) (Schwartz, 2005) and which, in mice, comprise more than 85% of the cells expressing the Fork Head BOX P3 transcriptional factor (FOXP3) (Khattri *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2005). These cells play determinant roles in the preservation of self-tolerance and in the control of graft and tumor rejection and inflammation, and their abrogation leads to autoimmunity and inflammatory diseases in several experimental models (Fontenot *et al.*, 2005; Schwartz, 2005).

In addition to their function in self-tolerance, TregN cells participate in the control of overwhelming responses to infectious agents such as viruses, bacteria and protozoan parasites (Raghavan et Holmgren, 2005; Belkaid, Sun et Bouladoux, 2006; Demengeot *et al.*, 2006; Suvas et Rouse, 2006). In malaria, TregN cells expand during infection with the *Plasmodium berghei* ANKA strain (*PbA*) (Nie *et al.*, 2007; Vigario *et al.*, 2007) and have been shown to inhibit the development of pathogenic Th1 cells, responsible for cerebral disease in resistant BALB/c mice (Nie *et al.*, 2007). These results contrast with the detrimental effects associated with TregN cells during *PbA* infection in susceptible C57BL/6 mice (Amante *et al.*, 2007). In this infection model, depletion of TregN cells results in a significant increase in survival, a minor but significant reduction in blood parasitemia and an important reduction in parasite load in the brain and vasculature. A comparable delay in the onset of peak parasitemia has been reported during *PbNK65* infection in mice depleted of TregN cells (Long *et al.*, 2003) and in the *PyL* infection model, elimination of TregN cells allows BALB/c mice to control otherwise lethal infections (Hisaeda *et al.*, 2004). Moreover, data provided by *Plasmodium falciparum* infections in humans correlates the expansion of TregN cells and the production of TGF- $\beta$  with accelerated parasite growth (Walther *et al.*, 2005). It was shown that TGF- $\beta$  tends to decrease TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  during *Plasmodium* infection (Li, Seixas et Langhorne, 2001). As these two cytokines are important in parasite control, this could explain the accelerated parasite growth reported in patient harboring elevated levels of TGF- $\beta$  in serum. Altogether, these observations attribute contrasting functions to TregN cells during *Plasmodium* infections.



Herein, the role of TregN cells in the lethality associated with *Pca* infection has been evaluated using two parasite strains with contrasting virulence, sustained by distinct parasite multiplication rates, and by the severity of inflammation and anaemia generated. Our results indicate that during *Pca* infection, TregN cells contribute to the control of overwhelming inflammatory responses and do not impair protective immune responses.

## 2.3. MATERIALS AND METHODS

### 2.3.1. Parasites, mice and infections

The *Pca* DS (lethal) and DK (non-lethal) strains derive from two different isolates (Killick-Kendrick et Peters, 1978). Female BALB/c mice, 4–6 weeks old (Charles River), were infected with  $10^5$  parasitized red blood cells (PRBC) by the i.p. route. Parasitemia was measured daily in methanol fixed tail blood smears stained with a 10% Giemsa solution in phosphate buffer saline (PBS).

### 2.3.2. Cell purification

Single-cell suspensions of splenocytes from naïve and *Pca*-infected mice (peak parasitemia) were prepared. In experiments assessing the contribution of CD90<sup>+</sup> splenocytes in the inflammatory response, T cells were removed using MACS CD90 microbeads (Miltenyi Biotec, USA), and levels of purity >95% were attained. CD4<sup>+</sup> T cells were enriched by negative selection using the EasySep mouse CD4<sup>+</sup> T cell enrichment kit (StemCell Technologies, Canada) and purity levels of 90–95% were obtained. Syngeneic adherent peritoneal macrophages were used as accessory cells and were shown to be >85% CD11b<sup>+</sup> cells following staining with anti-mouse CD11b monoclonal antibody (mAb) (clone CL8941F, Cedarlane Laboratories).

### 2.3.3. Assessment of CD4<sup>+</sup> T cell function

Purified CD4<sup>+</sup> T cells from naïve and infected mice (untreated or depleted of CD25<sup>+</sup> T cells *in vivo*) were co-cultured in 96-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) with naïve peritoneal MP ( $2 \times 10^4$  cells/well), and were stimulated with low endotoxin azide-free anti-CD3 mAb (4 µg/ml, clone C363.29B, Cedarlane Laboratories) or with 60,000 homologous PRBC. Culture supernatants from stimulated CD4<sup>+</sup> T cells were recovered 24 h or 72 h later for IL-2 and

IFN- $\gamma$  measurements by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. All samples were assessed in triplicate.

#### **2.3.4. Phenotypic characterization of TregN cells by flow cytometry**

Splenocytes from naïve and infected mice (moderate and peak infection) were co-stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CD4/L3T4 (clone GK1.5, Southern Biotech), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse CD25/IL-2 receptor alpha (IL-2R $\alpha$ , clone 7D4, Southern Biotech) and PE/Cy-7-conjugated anti-mouse CD69 (clone HI-2F3, Biolegend) mAbs following standard procedures. The cells were fixed and permeabilized in a fixation/permeabilisation solution and permeabilisation buffer (eBioscience, USA), and were incubated with anti-mouse FOXP3-PE mAb (clone FJK-16S, eBioscience, USA). The percentages and absolute numbers of FOXP3<sup>+</sup> T cells within the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> population were determined using a forward light scatter/side light scatter (FSC/SSC) gate on lymphocytes and a gate on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. CD69 expression in FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, and in CD4<sup>-</sup> splenocytes, was determined by a multiparametric analysis using a FACScan (Becton Dickinson, USA).

#### **2.3.5. *In vivo* depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells**

Depletion of CD25<sup>+</sup> T cells was carried out by i.v. administration of anti-mouse CD25 mAb (clone PC61, rat IgG1). The antibody was purified from supernatants from confluent cell cultures of the TIB-222 hybridoma (kindly provided by Dr. C. Piccirillo, McGill University) on a Hi-Trap Protein G column according to the instructions provided by the manufacturer. Mice received 500  $\mu$ g of the PC61 mAb by i.p. injection 1 day prior to and 1 day after infection. Depletion efficiency, assessed by FACS analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, ranged from 85% to 95%, and the effect was shown to persist for more than 10 days.

### 2.3.6. Quantification of IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$

IL-2 was measured in 24 h culture supernatants from CD4<sup>+</sup> T cells harvested from naïve and infected mice (untreated or depleted of CD25<sup>+</sup> T cells), following stimulation with homologous PRBC (60,000) or with anti-CD3 mAb (4  $\mu$ g/ml). Capture (Clone JES6-1A2) and detector (Clone JES6-5H4) anti-mouse IL-2 mAb (Caltag laboratories, USA) were used. Antigen-antibody complexes were detected with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Amersham Biosciences, USA) and the reactions were developed by addition of a TMB solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma). Absorbance at 450 nm was measured in a BioRad Model 550 microplate reader. IL-2 concentrations in samples were calculated against a standard curve generated with recombinant mouse IL-2 (Cedarlane Laboratories Ltd, CA).

Interleukin-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were measured in 72 h cultures of non-stimulated splenocytes (4.  $10^6$  cells/ml), CD4<sup>+</sup> T cells (4. $10^6$  cells/ml) and CD90<sup>+</sup> splenocytes (4. $10^6$  cells/ml) from naïve and infected mice (untreated or depleted of CD25<sup>+</sup> T cells) using the BD OptEIA™ sets for mouse IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (BD Biosciences, USA). IFN- $\gamma$  was also quantified in 72 h cultures of CD4<sup>+</sup> T cells from uninfected and infected mice, deprived or not of CD25<sup>+</sup> T cells, following stimulation with PRBC or with anti-CD3 mAb as described above.

### 2.3.7. Determination of haemoglobin in blood

Haemoglobin (Hb) concentrations were measured in control mice and in mice depleted of CD25<sup>+</sup> T cells (n = 7 per group) immediately before and every 2 days following infection. Briefly, 2  $\mu$ l tail-vein blood was diluted in 500  $\mu$ l Drabkin's solution (Sigma) and Hb was assayed in 96-well microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) in a volume of 100  $\mu$ l by measuring the absorption at 540 nm in a microplate reader. Values were converted to mg/ml using a standard curve of human Hb (Sigma) prepared in Drabkin's solution. All samples were assessed in duplicate.

### **2.3.8. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using a Mann–Whitney test for the comparison of parasite burden and blood haemoglobin content in control and anti-CD25 treated mice. A one-way analysis of variance (ANOVA) and Bartlett’s tests for equal variances were used when comparing three or more groups ( $\geq 6$  individual mice per category) using a GraphPad Prism Software (version 5.00; [www.graphpad.com/prism](http://www.graphpad.com/prism)).

## 2.4. RESULTS

### 2.4.1. Pro-inflammatory cytokines responses are enhanced during lethal *Pca* infection

In this study two closely related *Pca* strains were used: *Pca* DS and *Pca* DK (Perkins, Sarkar et Carter, 2007). Both of these strains were obtained from two distinct isolates (isolates DS 408XZ and DK 556KA respectively) recovered from *Plasmodium* infected thicket rats in Congo (Brazzaville) (Gadsby, 2008). These strains could be distinguished by differences in enzyme isoforms (isozymes) of the following: glucose phosphate isomerase (GPI), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), lactate dehydrogenase (LDH) and NADP-dependent glutamate dehydrogenase (GDH), as determined by starch gel electrophoresis (Gadsby, 2008). Compared to the *Pca* DK which is not lethal, the *Pca* DS triggers infections characterised by higher parasitemia and leading to the death of BALB/c mice. No definitive answer has been given to explain this virulence discrepancy. However, it has been shown that the *Pca* DS tends to produce more asexual merozoites and less gametocytes during blood stage malaria compared to the *Pca* DK. In addition, the *Pca* DK seems to infect only a certain population of RBC whereas the *Pca* DS appears to be less restricted (Gadsby, 2008). Gadsby *et al.* also observed that the *Pca* DS tends to colonize blood faster and identify ten loci involved in the multiplication speed difference between these two strains (Gadsby, 2008). However, in our hands, both strains tend to develop at the same speed.

In BALB/c mice and in other inbred and outbred mouse strains, inoculation of *Pca* DS PRBC resulted in elevated parasitemia (45–65%) and 100% mortality ((Scorza *et al.*, 2005) and unpublished results) (Fig. 2.1.a). In contrast, similar infective doses with DK parasites resulted in moderate infection (13–20% parasitemia) that resolved 12–13 days later in BALB/c mice (Fig. 2.1.a).

We compared the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 in 72 h culture supernatants of splenic cells from BALB/c mice with DS and DK infections, harvested on the day of peak parasitemia without further stimulation. Significantly higher concentrations of IFN- $\gamma$  (Fig.

2.1.b), TNF- $\alpha$  (Fig. 2.1.c) and IL-10 (Fig. 2.1.d) were measured in unstimulated splenic cell cultures from DS-infected mice.

#### **2.4.2. Parasite-specific Th1 effector cells are activated during lethal and non-lethal infection, but fail to produce IL-2 in response to anti-CD3 stimulation**

The functional state of purified CD4<sup>+</sup> T cells from infected mice was assessed at the moment of highest parasite burden, corresponding to peak parasitemia at days 9 and 10 following infection with DK or DS parasites, respectively. Specific IL-2 production by CD4<sup>+</sup> T cells in response to stimulation with homologous PRBCs was measured during the two infections, and was shown to be significantly higher in mice with DS malaria (Fig. 2.2.a). Interestingly, in comparison with cells from uninfected mice, an important reduction in IL-2 production in response to stimulation with anti-CD3 mAb was measured in CD4<sup>+</sup> T cells from infected mice. The impaired IL-2 response was more pronounced during DK malaria ( $86 \pm 8\%$  compared with  $64 \pm 7\%$  inhibition during DS infection) (Fig. 2.2.b). Independent of virulence, comparable specific IFN- $\gamma$  responses were detected when stimulating CD4<sup>+</sup> T cells from infected mice with PRBC (Fig. 2.2.c), as well as following stimulation with anti-CD3 mAb (Fig. 2.2.d).

#### **2.4.3. The absolute numbers of activated TregN cells significantly increase during lethal infection but their depletion does not abrogate the lethality associated with DS parasites**

TregN cells have been shown to control exacerbated inflammatory responses during *PbA* infections (Nie *et al.*, 2007). As the production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was shown to be significantly up-regulated during DS infection, we investigated whether TregN cells preferentially expanded in mice with lethal malaria. A lymphocyte gate was created to determine the percentages and absolute numbers of FOXP3<sup>+</sup> T cells within the splenic CD4<sup>+</sup> T cell population in naïve and infected mice (Fig. 2.3.a and b). Compared with uninfected controls, higher absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells were measured at peak infection with DS and DK parasites, and were shown to be particularly enhanced during DS infection at moderate parasitemia (17–21%) (Fig. 2.3.c). The total number of CD4<sup>+</sup> T cells

increased during infection and tended to be higher in DK-infected mice (Fig. 2.3.d), in correlation with the enhanced splenomegaly observed during non-lethal infection. A significant expansion of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells was measured during DS and DK infection (Fig. 2.3.e), and the total numbers of CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells were significantly higher in mice infected with DS parasites (Fig. 2.3.f).

We assessed the effect of the PC61 mAb on the kinetics of infection with the DS and DK strains. Two doses of antibody, administered one day prior to and one day after infection, eliminated more than 80% of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the infected mice and the effect was shown to persist until resolution of DK infection or until the attainment of peak DS infection (Fig. 2.4.a). Treatment with the depleting mAb led to a comparable and significant decrease in the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells in infected mice (Fig. 2.4.b). At peak infection (eight days following treatment), more than 70% of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells were eliminated in infected mice, whereas a 30% reduction was measured in uninfected animals. As expected, treatment with the anti-CD25 mAb resulted in a significant drop in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell numbers in infected and naïve mice (Fig. 2.4.c). A significant drop (>79%) in the total numbers of CD69<sup>+</sup> TregN cells was measured in mice with lethal infections, whereas a marginal inhibitory effect was observed in DK-infected mice (Fig. 2.4.d).

The depletion of CD25<sup>+</sup> T cells did not abrogate the virulence associated with *Pca*DS infection. In a first experiment, higher parasite burden and enhanced distress (lethargy, ruffled fur and hypothermia) became apparent from day seven p.i. in the treated group of mice. All the animals were sacrificed at day eight p.i. due to severe morbidity, and peak parasitemia was higher in the group of depleted mice on the day of death (Fig. 2.5.a). In a second experiment, the parasite burden was higher in the group of depleted mice at day seven p.i. when all these mice died, a day earlier than the control group (Fig. 2.5.b). The differences in parasitemia at day seven of infection with DS parasites were shown to be statistically significant between the treated and untreated groups (Fig. 2.5.c). In contrast, infections with non-lethal DK parasites were characterised by a marginal decrease in peak parasitemia in a first experiment (Fig. 2.5.d) or remained unaffected by the treatment in a second experiment (Fig. 2.5.e).



#### 2.4.4. Pro-inflammatory responses are further enhanced in absence of TregN cells

The expression of CD69, an early activation marker of T cells, NK cells, B cells and other cells, was compared between controls and depleted infected mice. A significant increase in the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells was measured at peak infection with lethal and non-lethal parasites. In the absence of CD25<sup>+</sup> T cells, this number further increased in DK-infected mice, whereas a marginal drop occurred in DS-infected animals (Fig. 2.6.a). As expected, the treatment with the PC61 mAb led to a drop in the relatively low numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells that increased during infection (Fig. 2.6.b). The elimination of CD25<sup>+</sup> T cells did not affect the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> splenocytes, which remained high and comparable at peak DS and DK infections (Fig. 2.6c).

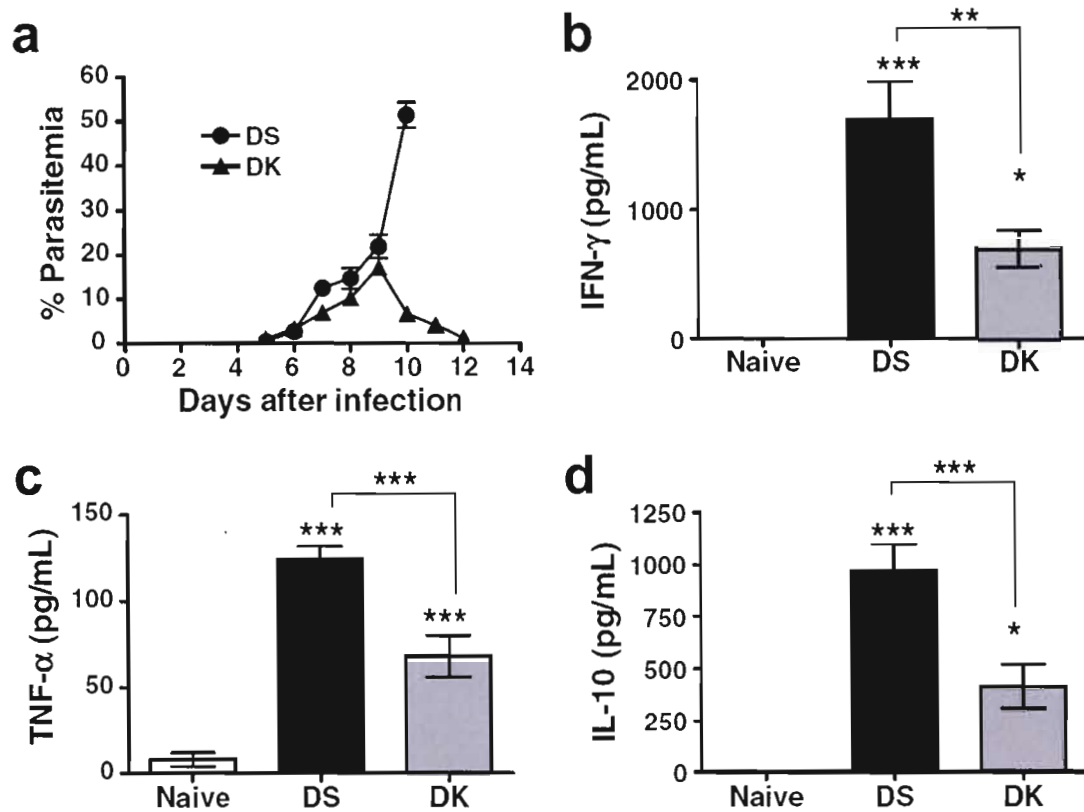
As the PC61 mAb may deplete activated effector CD4<sup>+</sup> T cells that transiently express the CD25 receptor, CD4<sup>+</sup> T cell effector responses (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) to PRBC and anti-CD3 stimulation were compared between control and depleted mice at peak infection. In the absence of CD25<sup>+</sup> T cells, parasite-specific IL-2 responses significantly increased in mice with DK infections, whereas they remained unchanged in DS-infected mice (Fig. 2.7.a). IL-2 production in response to stimulation with the anti-CD3 mAb marginally increased in mice depleted of CD25<sup>+</sup> cells, and this treatment did not restore the impaired IL-2 response in infected mice (Fig. 2.7.b). Interestingly, elimination of CD25<sup>+</sup> cells resulted in a dramatic increase in IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells from mice with DS infections (Fig. 2.7.c). In general, IFN- $\gamma$  responses to TCR stimulation with the anti-CD3 mAb were significantly enhanced in all of the experimental groups in the absence of CD25<sup>+</sup> cells (Fig. 2.7d). These results contrasted with those measured when eliminating CD25<sup>+</sup> cells within the population of purified CD4<sup>+</sup> T cells by magnetic sorting, which resulted in a significant decrease in both IL-2 and IFN- $\gamma$  responses (data not shown).

As pro-inflammatory cytokines are responsible for malaria disease (Clark *et al.*, 2006), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and anti-inflammatory IL-10 responses were compared between control and CD25-depleted mice. CD90<sup>-</sup> splenocytes and CD4<sup>+</sup> T cells were purified from infected mice at peak infection and were cultured for 72 h without further stimulation. In mice with DS infection, treatment with the PC61 mAb resulted in enhanced production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$

by CD90<sup>+</sup> cells from DS-infected mice (Fig. 2.8.a and b), and a comparable effect was observed for TNF- $\alpha$  in cells from naïve mice (Fig. 2.8.a). Low levels of IL-10 were detected in CD90<sup>+</sup> cell cultures from infected mice, and were significantly enhanced in infected mice following the depletion of CD25<sup>+</sup> T cells (Fig. 2.8.c). IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells significantly increased in naïve and infected mice (Fig. 2.8.d) and, surprisingly, IL-10 responses by CD4<sup>+</sup> T cells were low (0–40 pg/ml) and remained comparable in treated and untreated mice (data not shown).

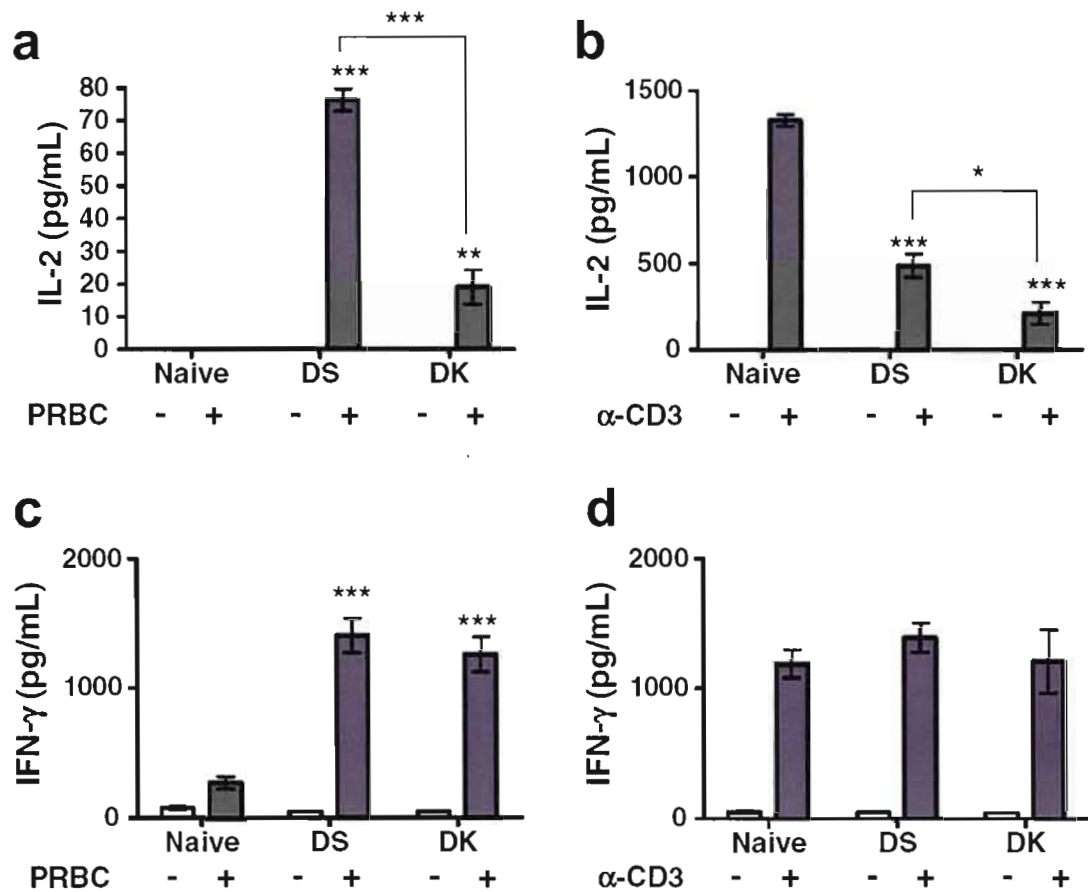
#### **2.4.5. Severe anaemia is generated during lethal infection and is enhanced in absence of TregN cells**

A final objective in our study concerned the characterisation of anaemia in mice depleted of TregN cells, as it is partially consequent to the inhibitory effects of inflammatory cytokines on erythropoiesis (Clark *et al.*, 2006). Severe anaemia was a hallmark of infection with lethal parasites and Hb values in DS-infected mice dropped below 80 mg/ml at days seven and eight p.i. (Fig. 2.9.a), contrasting with the moderate anaemia during DK infection (Fig. 2.9b). Depletion of CD25<sup>+</sup> T cells accelerated the onset of severe anaemia during lethal malaria, which became apparent at day six p.i. (Fig. 2.9.a). This treatment also significantly reduced blood Hb at peak infection with DK parasites (Fig. 2.9.b), but the levels of anaemia remained moderate.



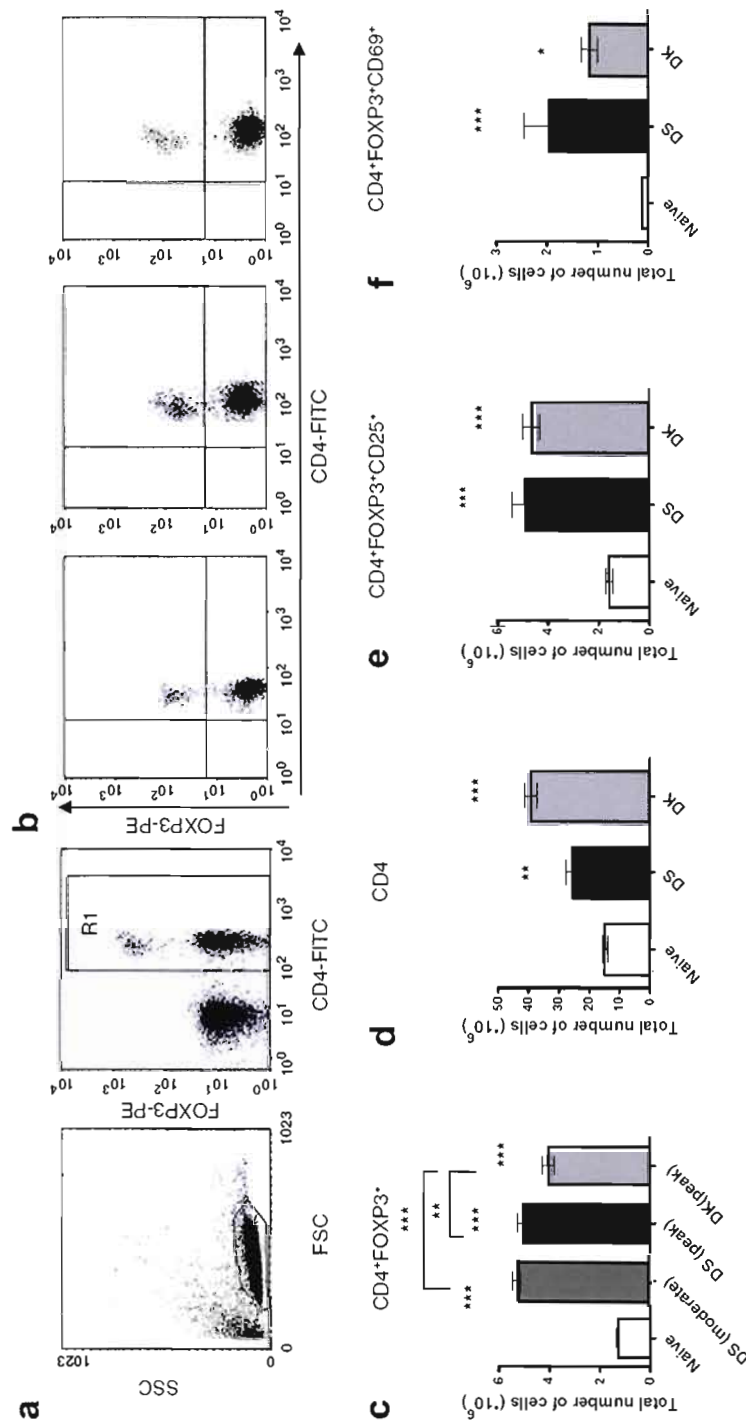
**Figure 2.1: The production of pro-inflammatory cytokines is enhanced during lethal *Pca* infection**

(a) Following i.p. injection of  $10^5$  PRBC, DS (lethal) strain infections (●) develop steadily, attaining high parasitemia and 100% mortality compared with DK (non-lethal) strain infections (▲) ( $n = 5$  mice per group). Seventy-two hours unstimulated splenic cells culture supernatants ( $4 \times 10^6$  cells/ml) from naïve, DS and DK-infected mice were assessed for IFN- $\gamma$  (b), TNF- $\alpha$  (c) and IL-10 (d) content (pg/ml), by ELISA. Bars represent the average  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 11 individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .



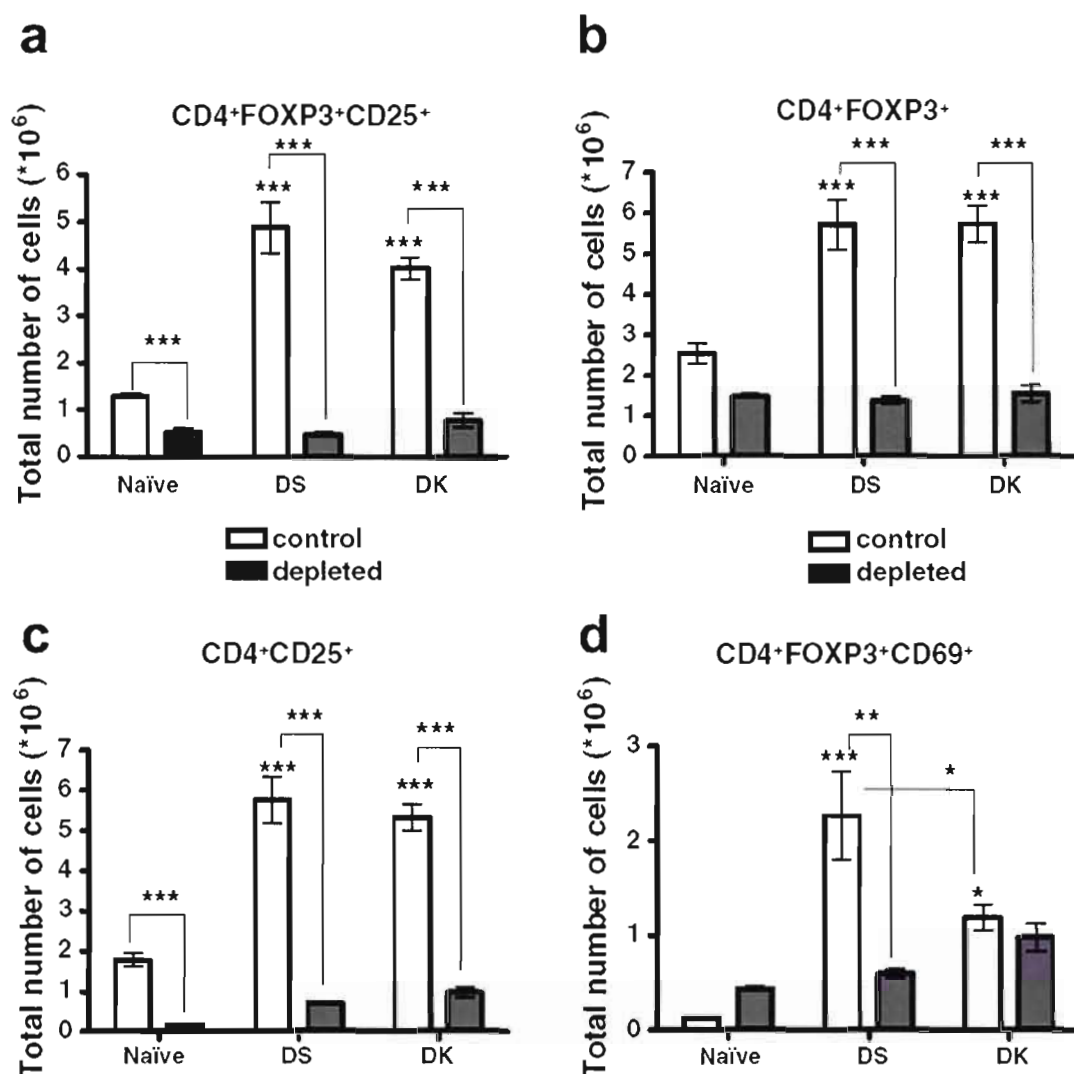
**Figure 2.2: Parasite-specific TH1 effector cells are activated during infection but fail to produce IL-2 in response to anti-CD3 stimulation**

CD4<sup>+</sup> T cells from naïve and infected mice (peak infection) were purified by negative selection, and were stimulated ( $5 \times 10^5$  cells/well) for 24 h (IL-2) or 72 h (IFN- $\gamma$ ) with homologous PRBC (60,000) or with anti-CD3 mAb (4  $\mu$ g/ml), in the presence of syngeneic naïve peritoneal MP ( $2 \times 10^4$  cells/well). IL-2 (a, b) and IFN- $\gamma$  (c, d) levels were measured in 24 and 72 h culture supernatants from unstimulated and stimulated CD4<sup>+</sup> T cells. Bars represent the average  $\pm$  SEM of six individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .



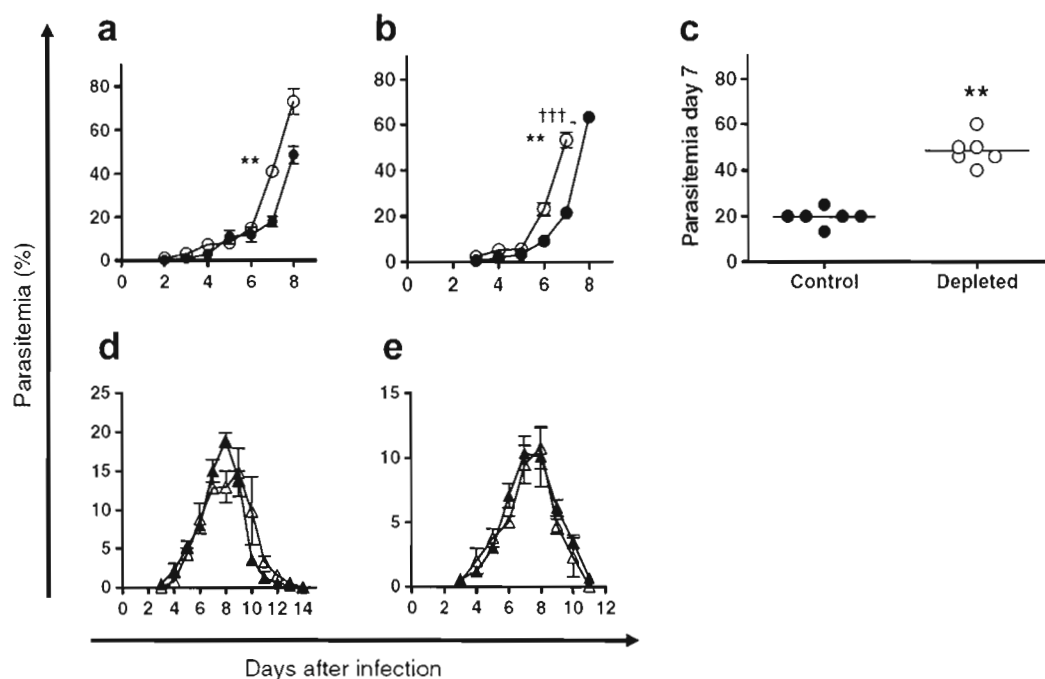
**Figure 2.3: The total numbers of activated Treg cells significantly increase during lethal DS strain infection**

Using a lymphocyte gate (a, b), the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (c), CD4<sup>+</sup> (d), CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (e) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (f) T cells were determined by flow cytometry in naïve and *Pca*-infected mice (peak parasitemia). Numbers in quadrants (b) show the percentages of FOXP3<sup>+</sup> cells within the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell population. The analysis in part c includes DS-infected mice with moderate (17-20%) and peak (45-60%) parasitemia, and non-lethal DK strain-infected mice with peak parasitemia (17-20%). Bars represent the average  $\pm$  SEM of 7 individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .



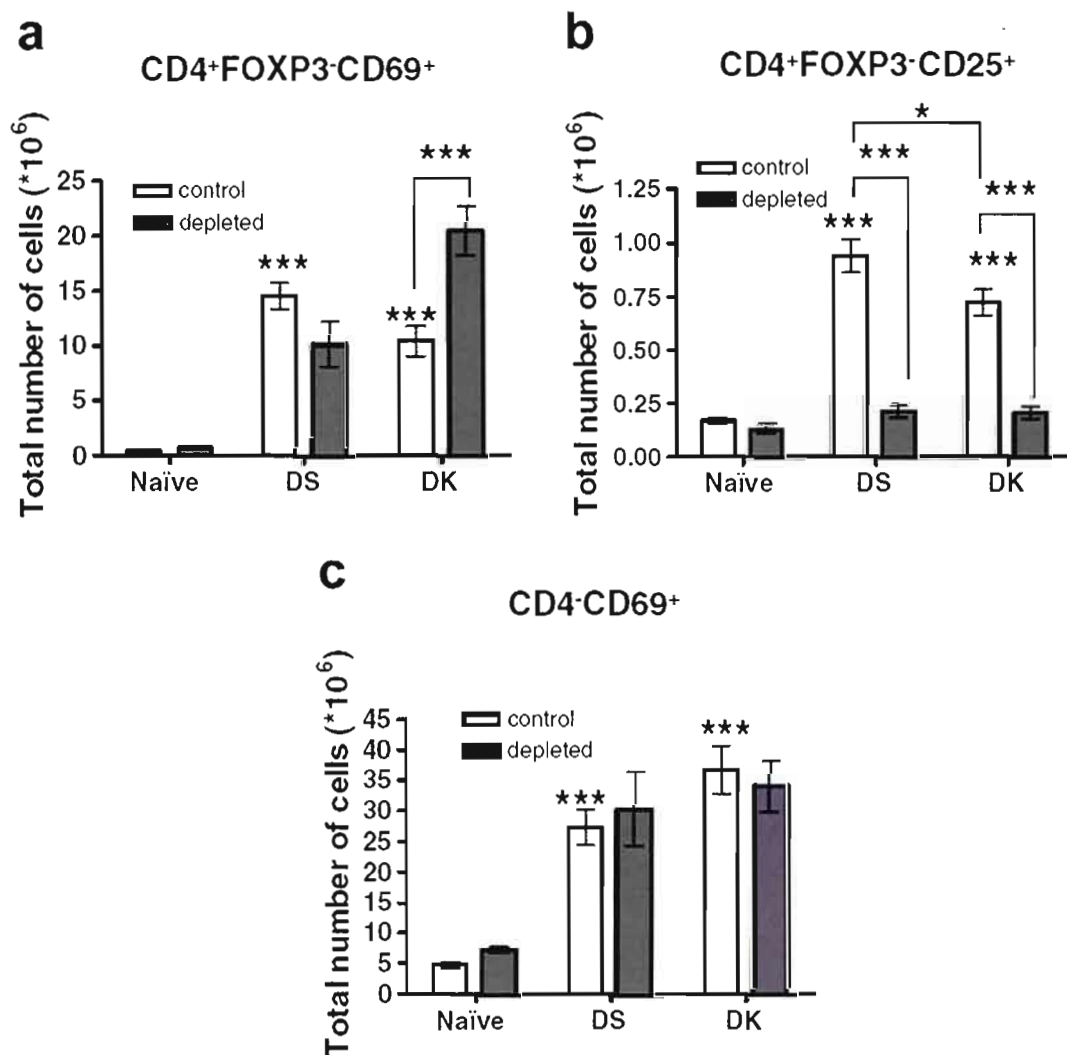
**Figure 2.4: Treatment with the PC61 mAb significantly eliminates the total numbers of activated Treg<sup>N</sup> cells in naïve and infected mice**

Groups of seven mice received 500  $\mu$ g of anti-mouse CD25 mAb by i.p. injection one day prior to and one day after infection. The absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (a), CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (b), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (c) and CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (d) cells were determined at peak infection by flow cytometry, using a gate on lymphocytes. Bars represent the average  $\pm$  SEM of seven individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 2.5: Depletion of TregN cells exacerbates the parasite burden in mice with lethal DS strain infection**

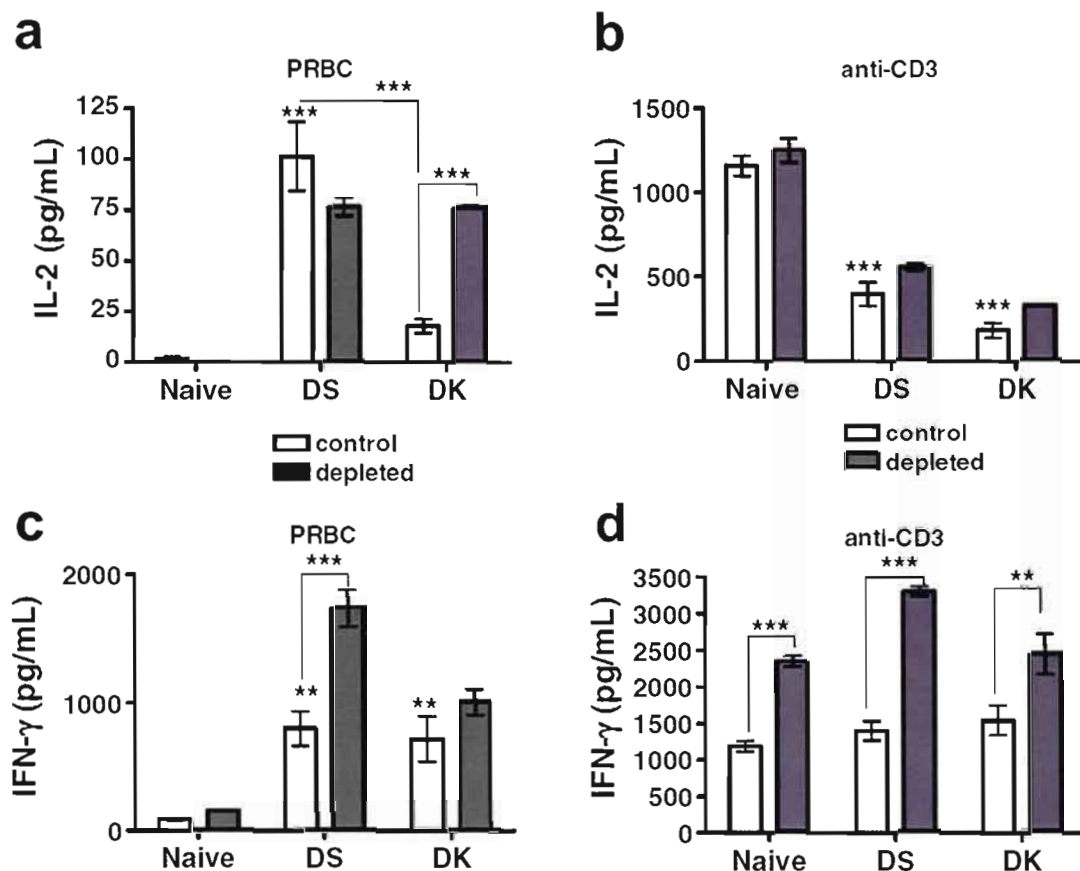
Mice received 500  $\mu$ g of anti-mouse CD25 mAb by i.p. injection one day prior to and one day after infection. Parasitemia (percent of PRBC  $\pm$ SEM) was measured daily starting from day three p.i. until peak parasite burden (DS), or until resolution of infection (DK). The progression of parasitemia in DS- (●; a, b) and DK- (▲; d, e) infected control (closed symbols) and depleted (opened symbols) mice was compared. (c) Peak parasitemia values at day 7 p.i. in mice from experiments a and b were grouped for analysis using a non-parametric Mann Whitney test. Three mice were included per group in all 4 experiments. \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 2.6:** *In vivo* administration of the PC61 mAb decreases the total numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> T cells but does not affect the numbers of activated CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> lymphocytes during infection

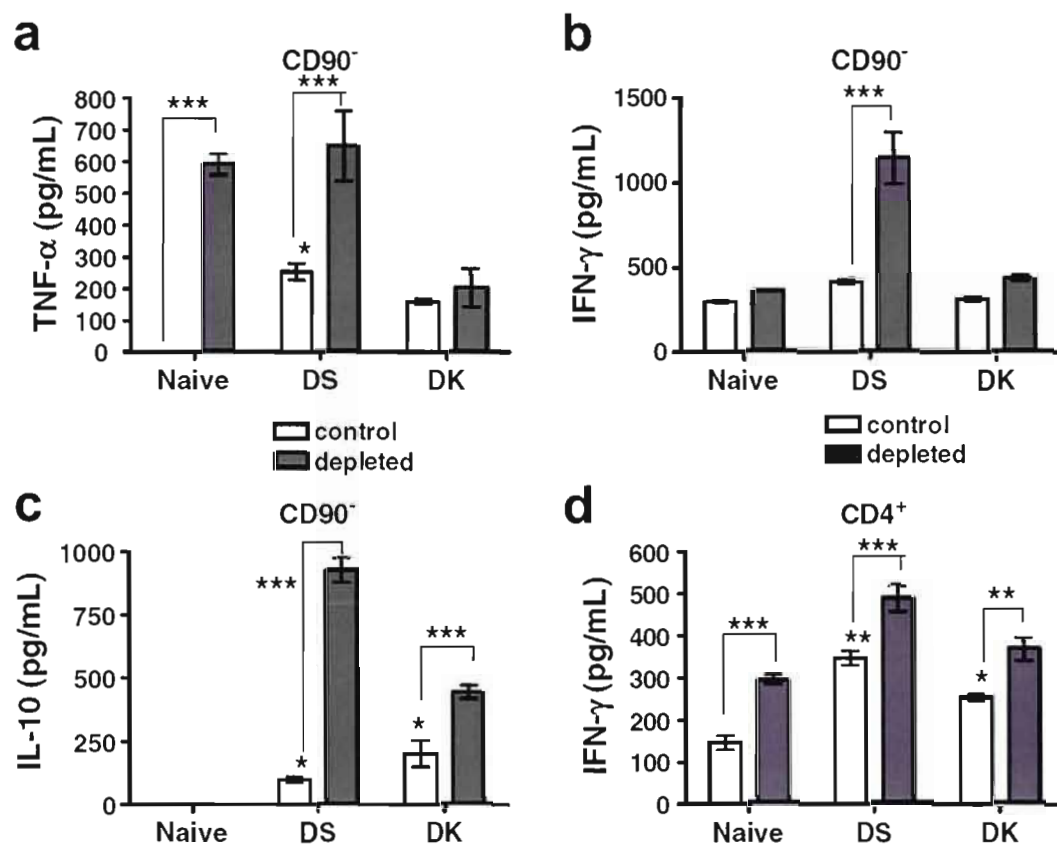
Absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> (a), CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (b) and CD4<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> (c) splenocytes in control mice and in mice depleted of TregN cells prior to infection. Bars represent the average  $\pm$  SEM of 10 individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05.





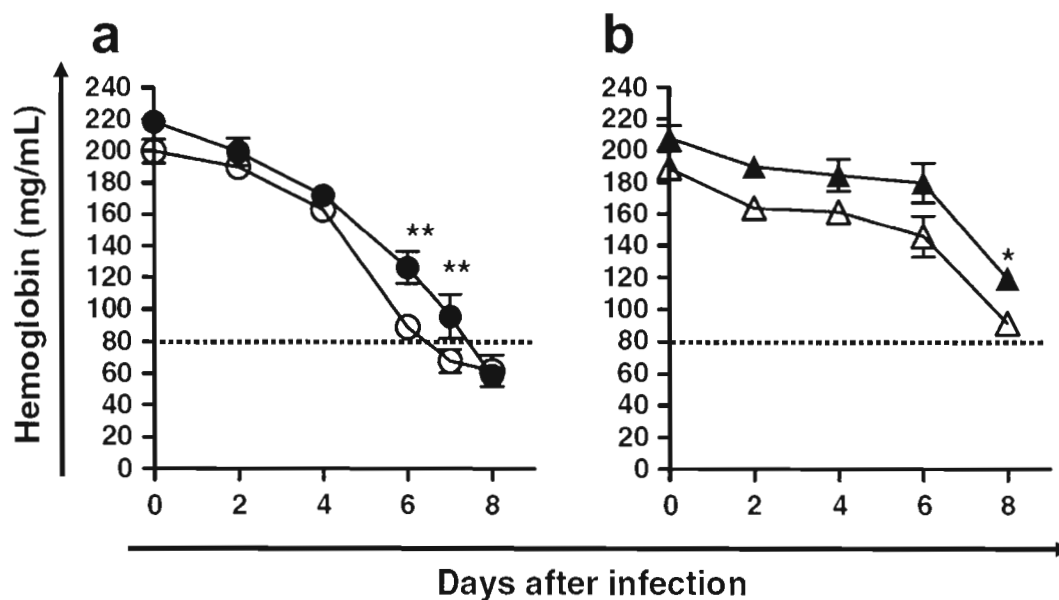
**Figure 2.7: Parasite specific IL-2 and IFN- $\gamma$  responses by CD4<sup>+</sup> T cells are restored in absence of TregN cells**

Seventy-two hours culture supernatants of CD4<sup>+</sup> T cell from naïve, DS and DK strain-infected mice ( $5 \times 10^5$  cells/well) and naïve syngeneic MP ( $2 \times 10^4$  cells/well) were assessed for IL-2 (a, b) and IFN- $\gamma$  (c, d) content (pg/ml) following stimulation with 60,000 homologous PRBC (a, c) or anti-CD3 mAb (4  $\mu$ g/ml) (b, d) by ELISA. Bars represent the average  $\pm$  SEM of 6 individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 2.8: The production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  is enhanced in the absence of TregN cells**

Concentrations of TNF- $\alpha$  (a), IFN- $\gamma$  (b, d) and IL-10 (c) in 72 h cultures of CD90<sup>-</sup> splenocytes (a-c) or CD4<sup>+</sup> T cells (d) from untreated (open bars) and TregN cell-depleted (closed bars) naïve and *Pca*-infected mice (peak infection). Similar concentrations of cells ( $4.10^6$  cells/ml) were assessed for the CD90<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup> populations. Bars represent the average  $\pm$  SEM of 7 individual mice per group. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\*\* P<0.001; \*\*P<0.01; \*P<0.05.



**Figure 2.9: Anaemia is exacerbated in absence of TregN cells**

The concentration of Hb in blood (mg/ml) was compared between control (closed symbols) and CD25-depleted (opened symbols) mice during *Pca* DS strain (●, a) and DK strain (▲, b) infection. Hb measurements with the Drabkin's reagent were taken immediately before administration of  $10^5$  PRBC, and every two days until attainment of peak parasite burden. Seven mice were included per group. Concentrations of Hb inferior to 80 mg/ml (dotted lines) were considered indicatives of severe anaemia. Statistical analysis was performed using a one way ANOVA and a Bartlett's test for equal variances. \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

## 2.5. DISCUSSION

In the present study, we show that the population of TregN cells significantly expands during lethal *Pca*DS infections. In this malaria infection model, TregN cells contribute to down-regulation of the severe inflammatory response but fail to protect the mice from the development of lethal anaemia and death.

Regulatory T cells participate in the attenuation of overwhelming inflammatory responses during infections with protozoa and helminths (Belkaid, Sun et Bouladoux, 2006). In BALB/c mice, resistant to *PbA* cerebral disease, the expansion of TregN cells has been shown to correlate with the control of pathogenic Th1 responses (Nie *et al.*, 2007). In contrast, detrimental effects have been associated with TregN cells in susceptible C57BL/6 mice, for which the *in vivo* elimination of TregN cells prevents the development of cerebral disease and leads to an important reduction of parasite load in the vasculature and brain. Interestingly, although the inflammatory response (up-regulation of vascular adhesion molecules, the recruitment of leukocytes to the brain and the production of TNF- $\alpha$  and IL-6) is not modified in C57BL/6 mice deprived of TregN cells prior to infection, a significant drop in the recruitment of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells to the brain is measured (Amante *et al.*, 2007).

Our data indicates an enhanced inflammatory response during DS infection which is accompanied by a significant increase in the number of activated TregN cells, and their elimination results in exacerbated inflammation, anaemia and blood parasite burden. Our results with *Pca* parasites, as well as those described during *PbA* and *PyL* infection reveal contrasting roles for TregN cells in different malaria models. Indeed, the detrimental versus beneficial functions attributed to TregN cells during malaria may depend on the pathology associated with the parasite species and strain (cerebral disease versus anaemia), the major histocompatibility complex (MHC) haplotype and genetic background of the host, as well as the timing and magnitude of the counter-inflammatory responses induced. Malaria infections are characterised by systemic inflammation which is responsible for disease in humans and in experimental hosts (Schofield et Grau, 2005; Clark *et al.*, 2006). As suggested by numerous studies in mice, an early inflammatory response is essential for the control of parasite multiplication (Stevenson *et al.*, 1995; Mohan, Moulin et Stevenson, 1997; Mitchell *et al.*,

2005). However, excessive inflammation is also a major contributor to cerebral pathology and haemolytic anaemia (Kurtzhals *et al.*, 1998; Othoro *et al.*, 1999), and thus counter-regulatory mechanisms are required for its control. In this context, the ability to survive *P. berghei* K173 or *PccAS* infection correlates with the timing and magnitude of TGF- $\beta$  production and its inhibitory effect on TNF- $\alpha$  release by immune cells (Omer et Riley, 1998; Omer, de Souza et Riley, 2003). IL-10 also plays a protective role in experimental models of cerebral malaria (Kossodo *et al.*, 1997), and has been shown to be essential for the control of inflammation during *Pcc* infection (Linke *et al.*, 1996).

In contrast to the results described for the virulent *PyL* infection model (Hisaeda *et al.*, 2004) we failed to detect inhibitory activities associated with TregN cells which could account for *PcaDS* virulence. Secretion of IL-2 by CD4<sup>+</sup> T cells in response to PRBC was particularly enhanced during DS infection and, interestingly, independent of the infection. IL-2 production in response to stimulation with anti-CD3 mAb was severely impaired in CD4<sup>+</sup> T cells. This scenario remained unchanged in the absence of TregN cells, despite the fact that specific IL-2 responses to PRBC were significantly restored in CD4<sup>+</sup> T cells from DK-infected mice. In contrast, robust parasite-specific IFN- $\gamma$  responses were measured by CD4<sup>+</sup> T cells in DS- and DK-infected animals, indicating comparable Th1 effector responses. It is possible that the failure to produce IL-2 during infection may be consequent to a state of exhaustion in T cells. A comparable phenomenon has been described in chronic infections with the human immunodeficiency virus (HIV) and the simian immunodeficiency virus (SIV), in which CD8<sup>+</sup> T cells expressing the programmed cell death receptor programmed death 1 (PD-1) (a negative regulator of activated T cells), exhibit an “exhausted” phenotype, failing to produce IL-2 and proliferate (Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2007).

The depletion of TregN cells had a major positive impact on the production of pro-inflammatory cytokines during DS infection. Significantly higher TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  responses were induced in cells other than T cells, and IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells was further stimulated *in vivo* and *in vitro* in the absence of CD25<sup>+</sup> T cells. Indeed, the expansion and activation of TregN cells could represent a counter-regulatory response to exacerbated inflammation during lethal infection. Parasitemia becomes higher late in DS infection, whereas the total numbers of TregN cells have significantly expanded when the mice have

moderate parasite burdens. IL-10 production was significantly induced during lethal infection, as measured in splenic cell culture supernatants. The levels of this regulatory cytokine were relatively low in CD90<sup>-</sup> cell culture supernatants from infected mice, and were greatly enhanced in the absence of TregN cells during infection. It is tempting to suggest that CD8<sup>+</sup> T cells, and not CD4<sup>+</sup> T cells, may represent an important source of IL-10 during *PcaDS* infection, as moderate levels of this cytokine (300–500 pg/ml) were detected in purified T cell cultures (data not shown). In early studies, CD8<sup>+</sup> T cells have been involved in the down-regulation of lymphoproliferative responses to native or recombinant malaria antigens (Riley, Jobe et Whittle, 1989; Mshana, McLean et Boulandi, 1990) and these cells are an important source of TGF- $\beta$  during blood-stage infection (Omer, de Souza et Riley, 2003). The discrepancies between our results with total splenic cells, CD90<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup> cell cultures suggest that other cells besides CD4<sup>+</sup> T cells and CD90<sup>-</sup> splenocytes are responsible for the high IL-10 response measured during lethal infection.

An obvious detrimental effect consequent to the depletion of TregN cells was the exacerbation of severe anaemia, which might explain the enhanced morbidity observed in DS-infected mice prior to attainment of peak parasitemia. Our results also illustrate the incapacity of the enhanced inflammatory response to control parasite multiplication, which was further enhanced during lethal infection. In addition, our data strongly suggest that the IL-10 response induced during lethal DS infection is not sufficient to control the inflammation and pathology generated.

An alternative hypothesis for the contrasting effect of TregN cell depletion in *PyL* and *PcaDS* infections may rely on the nature of the protective responses required to control parasite burden. During *PyL* infections TregN cells could exert their detrimental effects by suppressing B cell-dependent antibody production, which has been shown to be essential for the control of *Py* parasites (Roberts and Weidanz, 1979). In a study developed by Lim *et al.* (Lim *et al.*, 2005), a direct suppressive effect of TregN cells on B cells was suggested. Eddahri *et al.* (Eddahri *et al.*, 2006) proposed an indirect mechanism of action mediated by the suppression of the T helper cell activity required to generate antibodies and blocked by TGF- $\beta$  neutralising antibodies.

That additional factors may participate in *Plasmodium* virulence has been underlined by several studies such as the one developed by Fahey and Spitalny (Fahey et Spitalny, 1987) in which the lethality of *PyYM* parasites was associated with rapid parasite growth and the consequent failure of the immune system to cope with the infection. In line with this assumption, independent studies by Falanga and Pereira da Silva (Falanga et Pereira da Silva, 1989) and Yap and Stevenson (Yap et Stevenson, 1994) have demonstrated the rescue of *Plasmodium*-infected mice by blood transfusion, which allowed the development of protective immunity. Indeed, a rapid parasite multiplication rate, the anaemia resulting from the destruction of PRBC by the parasite, as well as from the inhibitory effects that inflammatory cytokines have on erythropoiesis, may all contribute to malaria lethality.

We remain cautious with respect to the nature of the population of FOXP3<sup>+</sup> cells expanding during *Pca* infection, as in humans transient expression of FOXP3<sup>+</sup> has been described in activated T cells, which also adopt suppressive phenotypes (Walker *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2007). Significantly marked T cell activation, measured as increased numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, was observed during lethal infection, correlating with the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells. Thus, the possibility that activated mouse effector T cells express FOXP3 to transiently down-regulate exacerbated effector responses cannot be excluded.

Future work will focus on the identification of the parasite factors responsible for uncontrolled inflammation during lethal DS infections. A delicate balance is required to cope with rapid parasite multiplication rates, which is initially under the control of the pro-inflammatory environment relying on phagocytes and NK cells (Urban, Ing et Stevenson, 2005). A complex pattern of interactions participate in the pathology associated with *Plasmodium* infections, and dissecting the factors and mechanisms involved remains an important and challenging task for the scientific community addressing malaria.

## **2.6. ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Le Programme d'aide à la Recherche PAFARC. M. Cambos is recipient of a FARE scholarship. The study was conducted in compliance with the regulations from the Animal Committee of the University of Quebec in Montreal (Protocol 0705-R1-508-0706).



# CHAPITRE III

## THE IL-12P70/IL-10 INTERPLAY IS DIFFERENTIALLY REGULATED BY FREE HEME AND HEMOZOIN IN MURINE BONE-MARROW-DERIVED MACROPHAGES

*Mathieu Cambos\*‡, Stefany Bazinet\*‡, Elie Abed\*, Jaime Sanchez-Dardon\*, Charlotte Bernard\*, Robert Moreau\*, Martin Olivier † and Tatiana Scorza\**

*\*Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montreal, Montreal, Quebec, Canada. †Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ‡Authors equally contributed to the work.*

Ce chapitre, présenté sous forme d'article scientifique, a été accepté pour publication dans la revue « International Journal for Parasitology » le 9 février 2010 et a nécessité l'implication de plusieurs personnes. La différenciation et la culture des MP dérivés de la moelle osseuse et les analyses de cytokines par ELISA ont été réalisées par S. Bazinet, le Pr. T. Scorza et l'auteur de cette thèse (M. Cambos). La détermination du ratio intracellulaire GSH/GSSG a été effectuée par J. Sanchez et M. Cambos alors que l'évaluation des ROS intracellulaires a été réalisée par J. Sanchez. Les immunobuvardages concernant l'HO-1 sont le travail de C. Bernard alors que ceux concernant la MAPK p38 et la MAPKAPK2 ont été réalisés par M. Cambos. Tous les travaux de RT-PCR ont été effectués par E. Abed dans le laboratoire du Pr. R. Moreau. L'HZ utilisée dans cette étude a été généreusement fournie par le Pr. M. Olivier. La rédaction du manuscrit a été réalisée par le Pr. T. Scorza en concertation avec M. Cambos et en tenant compte des commentaires judicieux des Pr. M. Olivier, R. Moreau et A. Jardim. T. Scorza a aussi contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant le support financier nécessaire et son expertise scientifique avisée. Pour des raisons écologiques et d'économie de papier, les références cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

### 3.1. ABSTRACT

The outcome of malarial anaemia is determined by a complex interplay between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines; its severity associated with accumulation of HZ in MP, elevated IL-10 responses and impaired IL-12 production. Although free heme contributes to malarial anaemia by inducing oxidative damage of RBC and enhancing their clearance by phagocytes, its impact on IL-12/IL-10 interactions has not been fully characterized. Herein, the effect of HE on IL-12 and IL-10 responses was studied in murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) and compared with synthetic HZ. Our data reveal that HE induces modest inhibition of IL-12p70 responses to LPS whereas HZ significantly impairs IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS through down-regulation of IL-12p35 and p40 gene expression. Although ROS are generated after short-term exposure to HE and HZ, prolonged exposure to these iron protoporphyrins has opposite effects on the cellular redox status, HE being the only compound able to promote persistent ROS production. Accordingly, the inhibitory effect of HE on IL-12p70 seems sustained by redox-dependent induction of IL-10 and is partially controlled by the p38 MAPK signalling pathway. Indeed, treatment with NAC or with the p38 MAPK inhibitor SB203580 inhibits IL-10 responses and significantly restores IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM. Our results suggest that oxidant stress induced by free heme may potentially contribute to sustained production of IL-10 and down-regulation of IL-12 responses in malaria.

### 3.2. INTRODUCTION

Dysfunctional erythropoiesis is frequently observed in inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and cancer (Caro *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2007; Nikolaisen, Figenschau et Nossent, 2008; Bergamaschi *et al.*, 2009). In this context, the systemic inflammation triggered by *Plasmodium* parasites has been shown to inhibit erythropoiesis in response to anaemia. Circulating levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are elevated in humans with severe malarial anaemia (Othoro *et al.*, 1999; Ageely, Dawoud et Heiba, 2008) and these cytokines impair the responsiveness of erythroid precursors to erythropoietin or promote their apoptosis (Felli *et al.*, 2005; Buck *et al.*, 2008).

IL-12 is a cytokine required for the generation of Th1 responses and for parasite clearance (Stevenson *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1998). In addition, IL-12 promotes the differentiation and growth of erythroid precursors *in vivo* and *in vitro* (Dybedal, Larsen et Jacobsen, 1995; Jacobsen *et al.*, 1996), which seems relevant for the control of malarial anaemia, as low levels of IL-12 correlate with anaemia severity in humans (Luty *et al.*, 2000; Perkins, Weinberg et Kremsner, 2000; Chaisavaneeyakorn *et al.*, 2003; Chaiyaroj *et al.*, 2004).

HZ, a bio-crystal of Hb-derived heme (Fe<sup>2+</sup> protoporphyrin) and the most studied player in malarial inflammation, is known to persist in tissues for several months following parasite clearance (MacCallum, 1969; Levesque, Sullivan et Meshnick, 1999). HZ contributes to the severity of anaemia as it impairs IL-12 responses by enhancing secretion of anti-inflammatory IL-10 (Keller *et al.*, 2006), and stimulates TNF- $\alpha$  production in MP and monocytes (Prada *et al.*, 1995; Sherry *et al.*, 1995; Nti *et al.*, 2005; Prato *et al.*, 2005).

Recently, justified attention has been given to free Hb and heme in malaria pathology (Ferreira *et al.*, 2008; Pamplona *et al.*, 2009; Seixas *et al.*, 2009). These two iron containing compounds are released during infection and in conditions of oxidative stress and high haemolysis as in malaria, free Hb oxidizes to metHb, liberating its prosthetic groups and further generating free heme (Jeney *et al.*, 2002). In patients suffering from severe malaria, free metHb levels are 2-3 time higher than those found in uninfected controls (Anstey *et al.*,

1996; Uko, Udoh et Etukudoh, 2003). Pamplona *et al.* also revealed that, in *Pba* infected mice C57BL/6, free HE increased from 0,5  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$  (Pamplona *et al.*, 2007). These results were corroborated in human where total HE in serum rose to 50  $\mu\text{M}$  in patients suffering from severe malaria. In parallel, uninfected control showed only 7  $\mu\text{M}$  of HE in serum (Andrade *et al.*). Free heme is a highly hydrophobic molecule that induces oxidative damage of non-infected and infected RBC membranes and enhances their removal by phagocytes, thus contributing to anaemia (Chiu, Kuypers et Lubin, 1989; Hebbel et Eaton, 1989; Gatidis, Foller et Lang, 2009).

In order to evaluate a possible contribution for free heme in cytokine-induced malarial dyserythropoiesis, we investigated the effect of exposure to hemin (HE) on IL-12 and IL-10 responses as well as on the redox status of murine BMDM. We hypothesized that HE, a potent oxidant, impairs IL-12p40 responses and enhances IL-10 responses in MP through oxidative stress. The effect of HZ was assessed in parallel since initial interaction with HZ is known to trigger the release of chemokines and pro-inflammatory cytokines in MP partially through redox-dependent signalling (Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005). Our data reveal that free heme down-regulates IL-12 responses through redox/p38 MAPK-dependent induction of IL-10, which contrasts with the inhibitory effects that HZ has both on IL-12 and IL-10 secretion.

### 3.3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.3.1. Chemicals

All chemicals including HE chloride (Fluka) and LPS (*Escherichia coli*, serotype 0111:B4) were purchased from Sigma Aldrich (Canada). SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinyl phenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole) was purchased from Cell Signalling (USA).

#### 3.3.2. Preparation of synthetic HZ

Synthetic HZ was prepared as previously described (Jaramillo et al., 2009; Shio et al., 2009) using high purity chemical reagents (>99% purity). Briefly, 0.8 mmol HE (Fluka) was dissolved in degassed NaOH (0.1 M) for 30 min with mild stirring, and the pH was adjusted to four by drop-wise addition of propionic acid. The mixture was allowed to anneal at 70 °C for 18 h and washed three times with NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M) for 3 h, after which it was washed with MeOH. All washes were alternated with distilled H<sub>2</sub>O. The sample was finally dried in a vacuum oven overnight over phosphorous pentoxide. All synthetic HZ samples were analyzed by X-ray powder diffraction, field emission gun scanning electron microscopy, and infra-red spectroscopy to characterize the crystalline state of HZ, and their purity was assessed by elemental analysis as previously reported (Jaramillo *et al.*, 2009; Shio *et al.*, 2009).

#### 3.3.3. Preparation of BMDM

Femoral marrows from 4 to 6 weeks old female BALB/c mice (Charles River Laboratories, Canada) were flushed and cells were plated at  $1.10^6$  cells/ml in culture Petri dishes (Saarstedt, Canada) using DMEM supplemented with 10% FBS, 1% HEPES, penicillin and streptomycin as culture medium (Invitrogen, Canada). The cells were differentiated with 50% mouse L929 fibroblast cell line culture supernatant as a source for

macrophage-colony stimulating factor. Following a six day culture, non-adherent cells were removed and adherent cells (BMDM) were recovered by detachment with a rubber policeman, after which the cells were washed twice with PBS (Invitrogen, Canada). Analysis of the cell preparation by flow cytometry revealed >95% CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> cells (data not shown). All mice used in this study were housed and handled in accordance with procedures approved by the Animal Care Committee of the University of Quebec in Montreal (protocol 562-R3-0510).

#### **3.3.4. Reactive oxygen species measurement**

BMDM suspensions were treated with HE or HZ (12.5, 25 and 50 µg/ml) for 4 or 18 h. The cells were recovered and labelled with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>-DCFDA, Molecular Probe, Invitrogen, Canada) (100 µM) for 30 min at 37 °C, and the mean cellular fluorescence was measured in a FACscan cytofluorometer.

#### **3.3.5. Determination of intracellular glutathione/glutathione disulphide (GSH/GSSG) ratios**

BMDM were plated at 2.10<sup>6</sup> cells/ml in complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media in 24-well plates (Sarstedt, Canada) and were treated with HE or HZ (25 µg/ml) for 18 h. Supernatants were removed and the cells were rinsed with PBS prior to direct sonication in cold MES buffer (0.2 M 2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid, 50 mM phosphate and 1 mM EDTA, pH 6.0). The cell homogenate was recovered and centrifuged and the particle clear supernatant was deproteinated by addition of equal volumes of 10% metaphosphoric acid. Fifty microliters of TEAM (4 M solution of triethanolamine) was added per milliliter of sample and the mixture was vortexed immediately. For GSSG determination, derivatization of GSH was effectuated with 2-vinylpyridine. Total GSH and GSSG in samples were then assessed with the Glutathione determination kit (Cayman Chemicals, USA).

### 3.3.6. SDS-PAGE and Western blot analysis of HO-1, p38 MAPK and MAPKAPK-2

For detection of HO-1,  $1.10^6$  BMDM/well (six-well plates, Saarsstedt, Canada) were treated with HE or HZ for 6 h (12.5–50  $\mu\text{g/ml}$ ) or 18 h (25  $\mu\text{g/ml}$ ) after which the cells were directly lysed in 200  $\mu\text{l}$  of Laemli buffer (Bio-Rad). Equal volumes of lysate were loaded onto 12% polyacrylamide gels for sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-C; Amersham Biosciences), after which the membranes were blocked overnight in SuperBlotto (Pierce Chemical Co., USA). Anti-HO-1 rabbit antibody (Assay Designs/Stressgen Bioreagents, USA) was used at 1  $\mu\text{g/ml}$  in Tris-buffered saline/Tween 20 for 2 h after which membranes were washed and further incubated with biotinylated anti-rabbit polyclonal antibody (Sigma). Membranes were then washed prior to the addition of substrate.

For analyses of p38 MAPK and MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2), BMDM were treated for 18 h with HE or Hz (25  $\mu\text{g/ml}$ ), after which recombinant IFN- $\gamma$  (100 U/ml; Cedarlane, Canada) was added 15 min prior to stimulation with LPS (50 ng/ml). In parallel, BMDM were treated 1 h with the p38 MAPK inhibitor SB203580 (1  $\mu\text{M}$ ) prior to stimulation. At 0, 30 and 60 min post-stimulation, the cells were washed twice with cold PBS (Invitrogen, Canada) and lysed in 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 275 mM NaCl, 20% glycerol (v/v), 2% IGEPAL (Sigma Aldrich, Canada), 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 20  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 20  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 50 mM NaF for 30 min on ice. The cell lysates were centrifuged (10,000 g, 15 min) and supernatant protein concentrations were quantified with the DC protein assay (Bio-Rad, Canada). About 20–60  $\mu\text{g}$  proteins/lane were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, and membranes were blocked as described above. Anti-p38, anti-phospho p38, anti-MAPKAPK-2 and anti-phospho MAPKAPK-2 antibodies (Cell Signaling Technology) were used following the manufacturer's instructions. Membranes were washed and incubated with anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (Sigma). Reactions were carried out with SuperSignal West pico chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). As controls for loading, anti- $\beta$ -actin (Biolegend) was used in combination with an anti-mouse Ig biotinylated polyclonal antibody (Amersham Biosciences) and a Streptavidin horseradish peroxidase

conjugate (GE Healthcare). Relative expression levels of HO-1 were normalized with respect to  $\beta$ -actin by densitometry.

### 3.3.7. Induction of IL-12p40, IL-12p70 and IL-10

BMDM were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well in a 96-well plate in complete medium (Invitrogen), and were treated with HE or HZ (25  $\mu$ g/ml) for 18 h. Secretion of IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 was induced by stimulation with LPS (50 ng/ml; Sigma Aldrich) or recombinant murine IFN- $\gamma$  (100 U/ml; Cederlane) 15 min prior to addition of LPS. IL-12p70, IL-12p40 and IL-10 levels in culture supernatants were determined 24 h later using the ELISA kits BD OpTEIA set mouse IL-12 (p70), and mouse IL-10 (BD Biosciences) and ELISA MAX<sup>TM</sup> Set Deluxe Mouse IL-12p40 (BioLegend). In some experiments, BMDM were treated with 1  $\mu$ g/ml anti-IL-10 mAb or control isotype antibody (Bio-Legend), NAC (0.25 mM, Sigma Aldrich), or 1  $\mu$ M p38 MAPK inhibitor (SB203580, Cell Signalling) 1 h prior to stimulation.

### 3.3.8. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total ribonucleic acid (RNA) was extracted from cells using TriZol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RT reactions were carried out with an Omniscript RT kit (Qiagen, Canada). The PCR amplifications were conducted with a Taq PCR core kit (Qiagen) using specific primers. IL-12p35 F: 50-AAGCTCTGCATCCTGCTTCAC-30, R: 50-GATAGCCCATCACCTGTTGA-30. IL-12p40, F: 50-CTCGCAGCAAAGCAAGGTAAG-30, R: 50-CTGAATCTGGACAGCC TCTAGATG-30. GAPDH F: 50-GGAGATTGTTGCCATCAACGA-30; R: 50-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-30. Each primer was designed in distinct exons to ensure specific transcript amplifications. Amplifications were carried out for 40 cycles with incubation for 1 min at 94 °C, 30 s at 58 °C and 1 min at 72 °C. Amplification products were resolved in a 2% agarose gel with ethidium bromide revelation. Relative expression of IL-12p35 and IL-12p40 was determined by densitometry.



### 3.3.9. Statistical analyses

Data was analyzed with GraphPad Prism software, using ANOVA for group comparison. Values represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. A *P* value  $\leq$  0.05 was considered significant.

### 3.4. RESULTS

#### 3.4.1. HE impairs IL-12p70 responses in BMDM through downregulation of IL-12p35 and IL-12p40 gene expression

To characterize the possible contributions of free heme on the down-regulation of IL-12, we evaluated the capacity of HE ( $\text{Fe}^{3+}$  protoporphyrin monomer) to modulate the secretion of IL-12p70. For this, BMDM were conditioned with 25  $\mu\text{g/ml}$  of HE, a concentration considered comparable with the level of Hb-derived heme released during mild *Plasmodium* infection (Sherry *et al.*, 1995; Sullivan, Ittarat et Meshnick, 1996). Eighteen hours later, the cells were stimulated with LPS or IFN- $\gamma$ /LPS for 24 h after which IL-12p70 content was assessed in culture supernatants by ELISA.

In six independent experiments, HE had modest inhibitory effects on IL-12p70 responses to LPS (Fig. 3.1.A;  $P < 0.05$ ) but significantly inhibited its secretion in response to IFN- $\gamma$ /LPS (Fig. 3.1.B;  $P < 0.001$ ). In contrast, exposure to HZ resulted in impaired IL-12p70 responses to both LPS (Fig. 3.1.A;  $P < 0.01$ ) and IFN- $\gamma$ /LPS (Fig. 3.1.B;  $P < 0.001$ ).

Since biologically active IL-12p70 is formed from a 35 kDa (IL-12p35) and a 40 kDa (IL-12p40) subunit, we assessed the effect of HE on IL-12p40 secretion (as homodimer and heterodimer). In response to LPS stimulation, inhibition of IL-12p40 secretion was induced by HE (Fig. 3.1.C;  $P < 0.001$ ), an effect that was also caused by HZ (Fig. 3.1.C;  $P < 0.001$ ). Comparable modest inhibition was induced by HE and HZ on IL-12p40 responses to IFN- $\gamma$ /LPS (Fig. 3.1.D;  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). Comparable effects were measured in response to stimulation with the TLR2 agonist Pam3Cys4 (data not shown). The effects of HE or HZ on IL-12p70 responses were sustained for more than 72 h and were induced after 2 h treatment with the protoporphyrins (data not shown).

As IL-12p70 and not IL-12p40 secretion was significantly affected by HE, IL-12p40 and IL-12p35 gene expression were studied by RT-PCR (Fig. 3.2). No apparent effect was revealed on IL-12p40 gene expression by RT-PCR in two independent experiments of which a representative result is shown in Fig. 3.2.A. Although IL-12p35 mRNA remained

undetectable in resting BMDM, comparable levels of induction were measured for control, HE- and HZ-conditioned cells in response to LPS stimulation (Fig. 3.2.A). Differences in IL-12p40 and IL-12p35 gene expression with respect to control BMDM became apparent in response to IFN- $\gamma$ /LPS, for which comparable inhibition was induced by HE and HZ on both IL-12p40 (Fig. 3.2.B) and IL-12p35 mRNA expression (Fig. 3.2.C). Altogether, these results indicate that, similar to HZ, HE significantly down-regulates IL-12p40 and IL-12p35 gene expression and consequently IL-12p70 secretion.

#### **3.4.2. HE inhibits IL-12p70 responses through an IL-10-dependent mechanism**

IL-10 is a primary physiological inhibitor of IL-12. Importantly, the intracellular redox status of antigen presenting cells seems to influence in an IL-10-dependent manner their capacity to produce IL-12 as low levels of reduced GSH down-regulate IL-12 production and enhance IL-10 responses (Murata, Shimamura et Hamuro, 2002). Based on this information we determined the effects of HE and HZ on IL-10 secretion.

In BMDM, exposure to HE increased IL-10 secretion both in response to LPS and IFN- $\gamma$ /LPS (Fig. 3.3;  $P < 0.01$ ), whereas production of this anti-inflammatory cytokine was significantly impaired in HZ-conditioned BMDM (Fig. 3.3;  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , for LPS and IFN- $\gamma$ /LPS stimulation, respectively). Overall, IFN- $\gamma$  efficiently reduced IL-10 secretion in control BMDM and HZ-conditioned BMDM (Fig. 3.3;  $P < 0.001$ ), an effect that was absent in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.3). In the absence of TLR stimulation, IFN- $\gamma$  did not induce IL-12p40 or IL-12p70 secretion.

In order to confirm a possible link between enhanced IL-10 responses and the down-regulation of IL-12p70 responses in HE-conditioned cells, BMDM were treated with anti-IL-10 neutralizing mAb or control isotype mAb 1 h prior to stimulation. Although IL-10 neutralization significantly enhanced IL-12p70 responses to LPS in control BMDM (Fig. 3.4.A,  $P < 0.05$ ) it did not modify the response in HE-treated BMDM nor in HZ-treated cells (Fig. 3.4.A). In contrast, neutralization of IL-10 had a major positive impact on IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.4.B;  $P < 0.001$ ) but did not improve these responses in control or HZ-conditioned BMDM (Fig. 3.4.B).

### 3.4.3. Prolonged exposure to HE induces ROS and decreases GSH/GSSG ratios on BMDM

HE is a potent inducer of HO-1 (Lang *et al.*, 2005; Desbuards *et al.*, 2007; Lakkisto *et al.*, 2009), an enzyme that attenuates several pathologies of an inflammatory nature (Desbuards *et al.*, 2007; Zhen-Wei *et al.*, 2007; Kubulus *et al.*, 2008), and restores cellular redox balance (Wu *et al.*, 2008; Brunt *et al.*, 2009). In order to evaluate the capacity of BMDM to control HE-induced oxidant stress, intracellular levels of ROS were determined in BMDM treated for 4 and 18 h with HE. As HZ has been shown to modulate chemokine and cytokine responses in macrophages partially through redox-dependent stress (Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005), BMDM were also treated with HZ for comparative purposes.

Levels of ROS were first analyzed in H<sub>2</sub>-DCFDA-labelled BMDM after a 4 h treatment with 12.5–50 µg/ml of HE or HZ, and the mean channel fluorescence was measured by flow cytometry. At 12.5–50 µg/ml, HE induced important levels of ROS compared with control BMDM (Fig. 3.5.A,  $P < 0.001$ ). Exposure to HZ also induced ROS (Fig. 3.5.A,  $P < 0.001$ ), but the effects were significantly lower than those conferred by HE (Fig. 3.5.A;  $P < 0.001$ ).

ROS levels were also measured in BMDM conditioned with HE or HZ for 18 h. Relative to the 4 h treatment, ROS sharply decreased in HE-conditioned cells, but remained significantly higher than in control BMDM (Fig. 3.5.B;  $P < 0.01$  for 12.5 µg/ml and  $P < 0.001$  for 25 and 50 µg/ml). In contrast, after 18 h treatment, exposure to HZ decreased intracellular ROS to levels below those measured in control cells (Fig. 3.5.B;  $P < 0.001$ ). The inhibitory effect of HZ on ROS levels became apparent after 5 h of treatment and was sustained for more than 48 h (data not shown).

Total GSH and intracellular GSH/GSSG ratios were also determined in BMDM treated with HE or HZ for 18 h (Fig. 3.6). Although HE failed to modify total GSH or reduced GSH concentrations, their levels were significantly elevated in HZ-conditioned cells (Fig. 3.6.A, B;  $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively). In contrast, the concentrations of GSSG increased in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.6.C;  $P < 0.001$ ) but were not affected by HZ. In accordance with the ROS response measured at 18 h post-treatment with HE, GSH/GSSG

ratios were significantly decreased in these cells (Fig. 3.6.D;  $P < 0.001$ ), whereas elevated GSH/GSSG ratios were measured in HZ-conditioned BMDM (Fig. 3.6.D;  $P < 0.001$ ).

As mentioned previously, HE is a known inducer of HO-1, the enzyme that catalyzes the cleavage of the protoporphyrin ring, generating CO, biliverdin and free iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Otterbein et Choi, 2000). Biliverdin is further converted to bilirubin by biliverdin reductase whereas  $\text{Fe}^{2+}$  induces up-regulation of iron-binding ferritin and iron exclusion (Bach, 2005). Importantly, these products contribute to the control of inflammation through various mechanisms including IL-10 up-regulation (Otterbein *et al.*, 2000; Otterbein et Choi, 2000). In BMDM, 6 h exposure to HE promoted dose-dependent induction of HO-1 protein expression (Fig. 3.7.A). At 25  $\mu\text{g/ml}$ , the effect was significant in three independent experiments (Fig. 3.7.C,  $P < 0.01$ ). Six hours exposure to HZ also induced HO-1 expression in a dose-dependent manner, but as with the ROS response, the effect was milder compared with HE. Following 18 h exposure, HO-1 protein levels were relatively higher only in BMDM conditioned with 25  $\mu\text{g/ml}$  of HE although the differences with respect to BMDM were not statistically significant (Fig. 3.7.C).

#### 3.4.4. NAC reverts the inhibitory effect of HE on IL-12p70 responses

We hypothesized that the down-regulation of IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM was concurrent to redox-dependent induction of IL-10. We therefore evaluated whether treatment with the GSH precursor NAC reverted the IL-12p70 inhibition in HE-treated BMDM (Fig. 3.8). Interestingly, as with IL-10 neutralization, treatment with NAC enhanced IL-12p70 responses in control BMDM (Fig. 3.8.A;  $P < 0.05$ ), but did not revert the inhibitory effects of HE nor HZ on IL-12p70 response to LPS (Fig. 3.8.A). However, NAC restored IL-12p70 response to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.8.B;  $P < 0.001$ ) whereas it did not modify the responses in HZ-conditioned BMDM. Treatment with NAC did not affect IL-10 responses to LPS in any of the groups (Fig. 3.8.C), but it significantly decreased IL-10 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.8.D;  $P < 0.001$ ). Altogether these results suggest that, albeit inducing HO-1 expression, exposure to HE increases ROS and decreases intracellular GSH/GSSG ratios, and that these

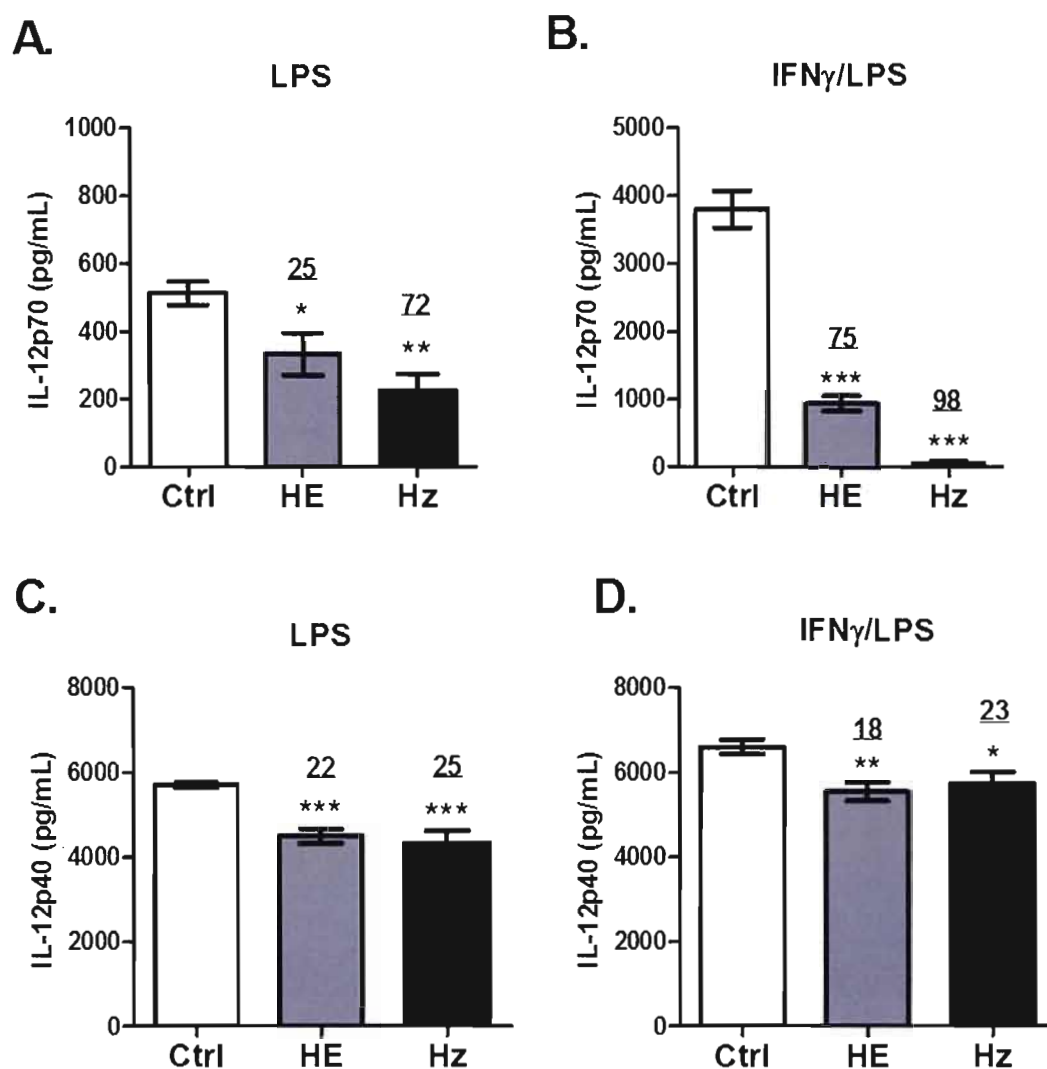
effects are associated with up-regulation of IL-10 secretion and concomitant inhibition of IL-12p70 responses.

#### **3.4.5. Inhibition of p38 MAPK restores IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM**

MKK3-deficient MP are deficient in IL-12p40/IL-12p35 responses, suggesting a pivotal role for the MKK3/p38 MAPK pathway in IL-12p70 production (Lu *et al.*, 1999). As IL-12p40 responses in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are enhanced by the p38 MAPK selective inhibitor SB203580 (<10  $\mu$ M range) (Marriott, Clarke et Dalglish, 2001), it has been suggested that LPS activation of p38 MAPK may have a dual impact on IL-12 (Salmon *et al.*, 2001). Indeed by interfering with IL-10 production, inhibition of p38 MAPK may stimulate IL-12 secretion in conditions associated with robust IL-10 responses (Salmon *et al.*, 2001). The stimulatory effect of SB203580 on IL-12 is obvious at concentrations lower than 5  $\mu$ M, and correlates in a dose-dependent manner with drops in IL-10 levels (Salmon *et al.*, 2001). Based on this information, we evaluated whether SB203580 could rescue IL-12p70 responses in HE-conditioned BMDM. As high concentrations of SB203580 may affect kinases other than p38 MAPK (Lee *et al.*, 1999; Lali *et al.*, 2000), a 1  $\mu$ M concentration of inhibitor was used. When assessed at the 1  $\mu$ M concentration, SB203580 decreased in a reproducible manner IL-10 secretion in control BMDM without compromising the IL-12p70 response (data not shown). When used 1 h prior to IFN- $\gamma$ /LPS stimulation, 1  $\mu$ M of SB203580 reduced more than 50% phosphorylation of MAPKAPK-2, which is a specific downstream substrate of p38 MAPK (Fig. 3.9).

Pre-treatment with SB203580 significantly increased IL-12p70 responses to LPS in both control BMDM and HE-conditioned BMDM (Fig. 3.10.A;  $P < 0.001$ ). However, SB203580 rather accentuated the deficiency induced by HE with respect to control BMDM treated with the inhibitor (Fig. 3.10.A;  $P < 0.001$ ), whereas it did not affect IL-12p70 responses to LPS in HZ-conditioned BMDM. In contrast, inhibition of the p38 MAPK enhanced IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.10.B;  $P < 0.05$ ) abrogating the relative inhibitory effects of HE, whereas it further impaired those

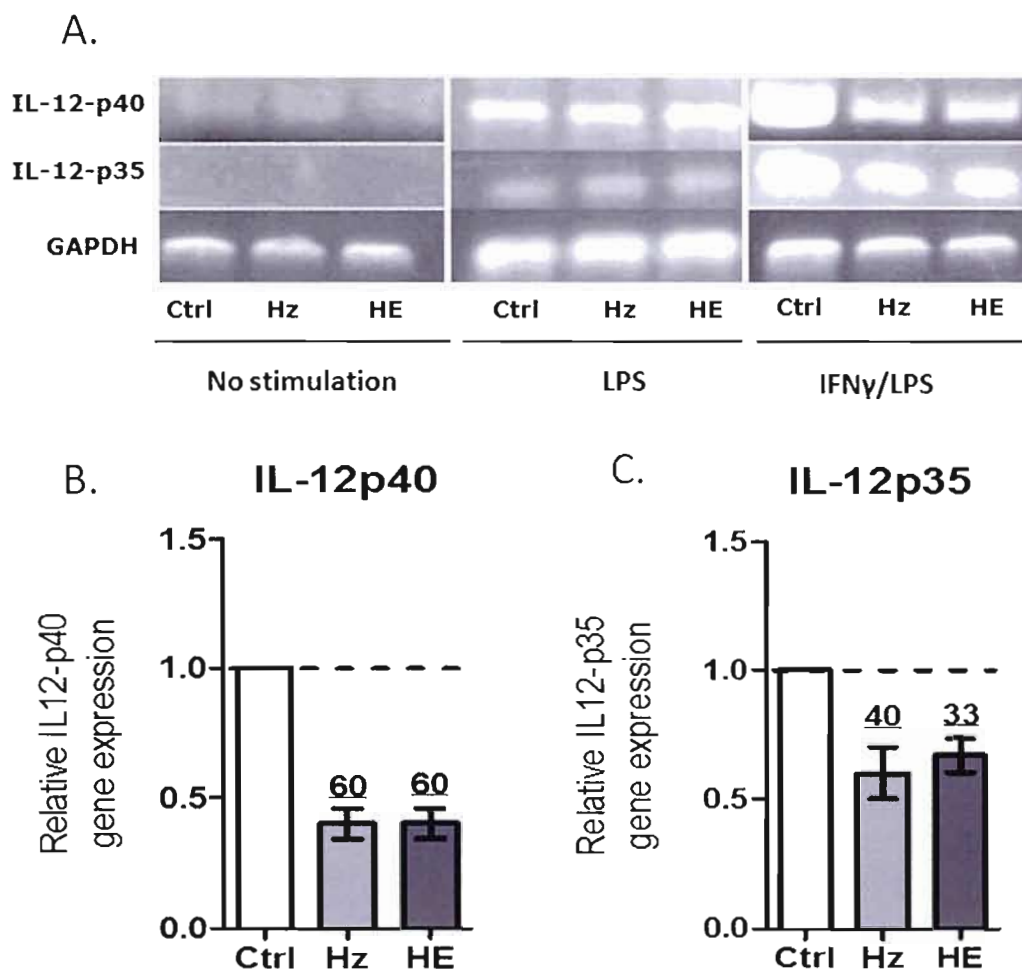
responses in HZ-treated BMDM (Fig. 3.10.B). In parallel, SB203580 significantly reduced IL-10 responses to LPS in all groups (Fig. 3.10.C;  $P < 0.001$ ), and had only a significant negative effect on IL-10 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM (Fig. 3.10.D;  $P < 0.001$ ).



**Figure 3.1: HE has a major negative impact on IL-12p70 responses to IFN-γ/LPS which is unrelated to down-regulation of IL-12p40 secretion**

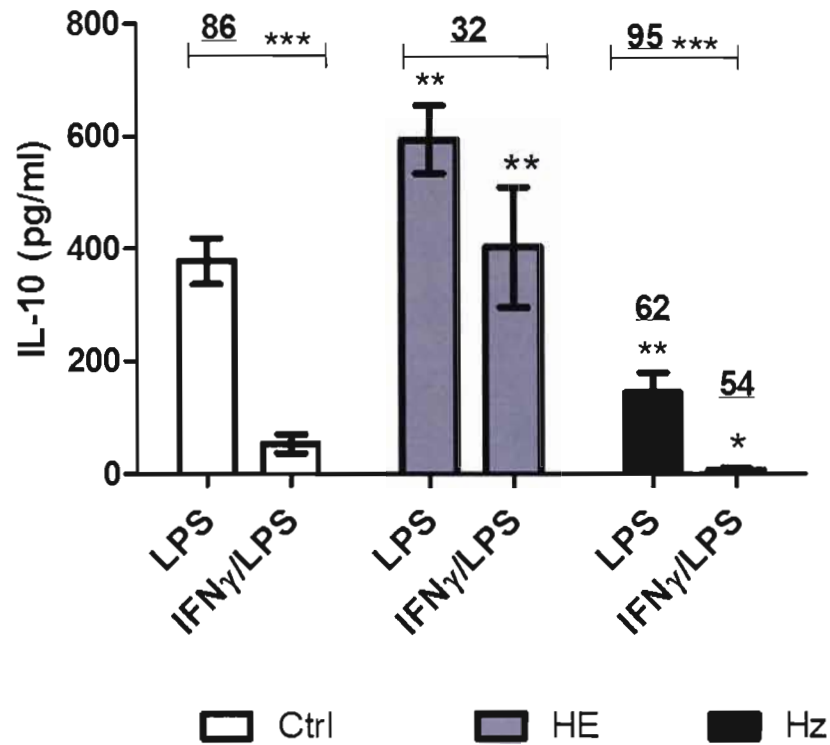
BMDM ( $1.10^5$  cells/well) were cultured in 96-well culture plates in the presence of HE or HZ (25  $\mu$ g/ml) for 18 h and stimulated with LPS (50 ng/ml) (A, C) or with IFN- $\gamma$  (100 units/ml) 15 min prior to LPS treatment for 24 h (B, D). Culture supernatants were assessed for IL-12p70 and IL-12p40 content by ELISA. Error bars represent mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments. Cytokine concentrations were compared with a one-way ANOVA; percentages of inhibition in respect to controls (Ctrl) are indicated by underlined numbers. \*\*\* $P$ <0.001, \*\* $P$ <0.01; \* $P$ <0.05.





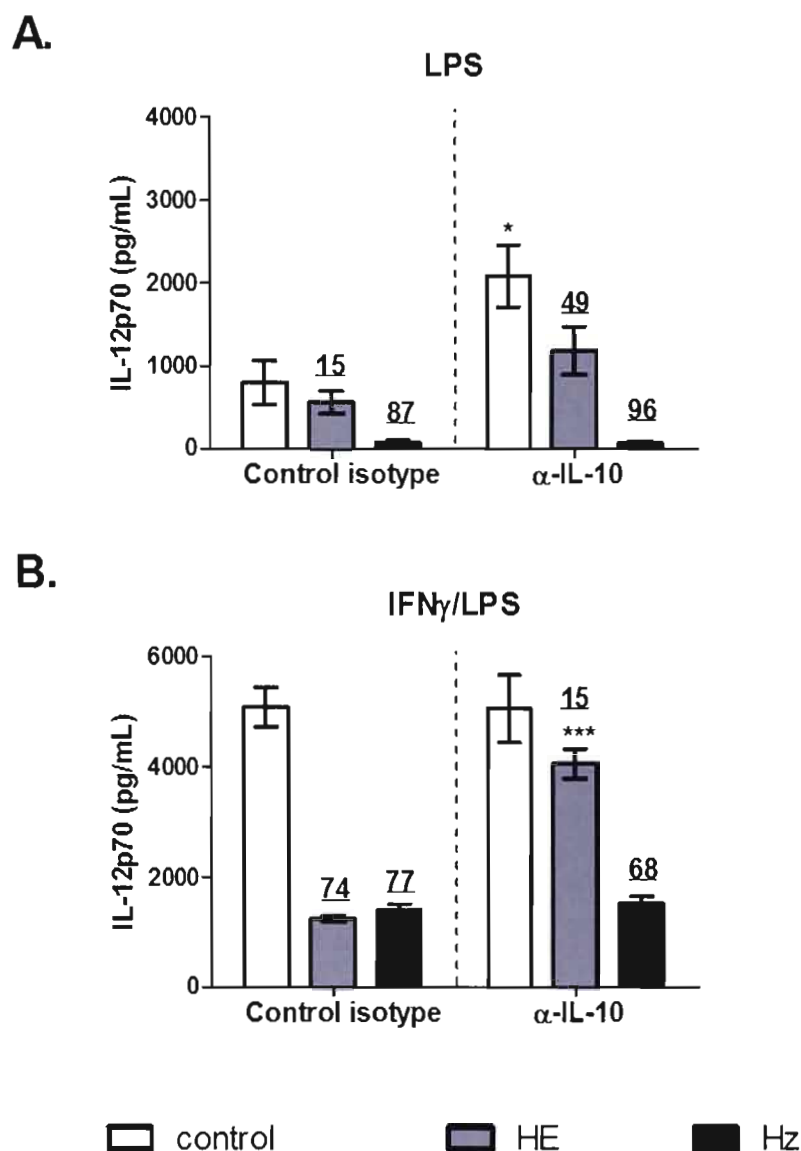
**Figure 3.2: HE and HZ down regulate IL-12p35 and IL-12p40 gene expression in response to IFN- $\gamma$ /LPS stimulation**

(A) Control (Ctrl), HE and HZ-conditioned BMDM ( $3 \times 10^6$  cells/well) were stimulated for 6 h with LPS (50 ng/ml) or pre-stimulated 15 min with IFN- $\gamma$  (100 units/ml) prior to addition of LPS. Total RNA was isolated from the cells and the levels of IL-12p35, IL-12p40 and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcripts were determined by semi-quantitative RT-PCR as described in the Materials and Methods section. Relative expression levels of IL-12p40 (B) and IL-12p35 (C) in HE- and HZ-conditioned BMDM (25  $\mu$ g/ml, 18 h) stimulated with IFN- $\gamma$ /LPS are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The percentages of inhibition in gene expression relative to controls are indicated by underlined numbers.



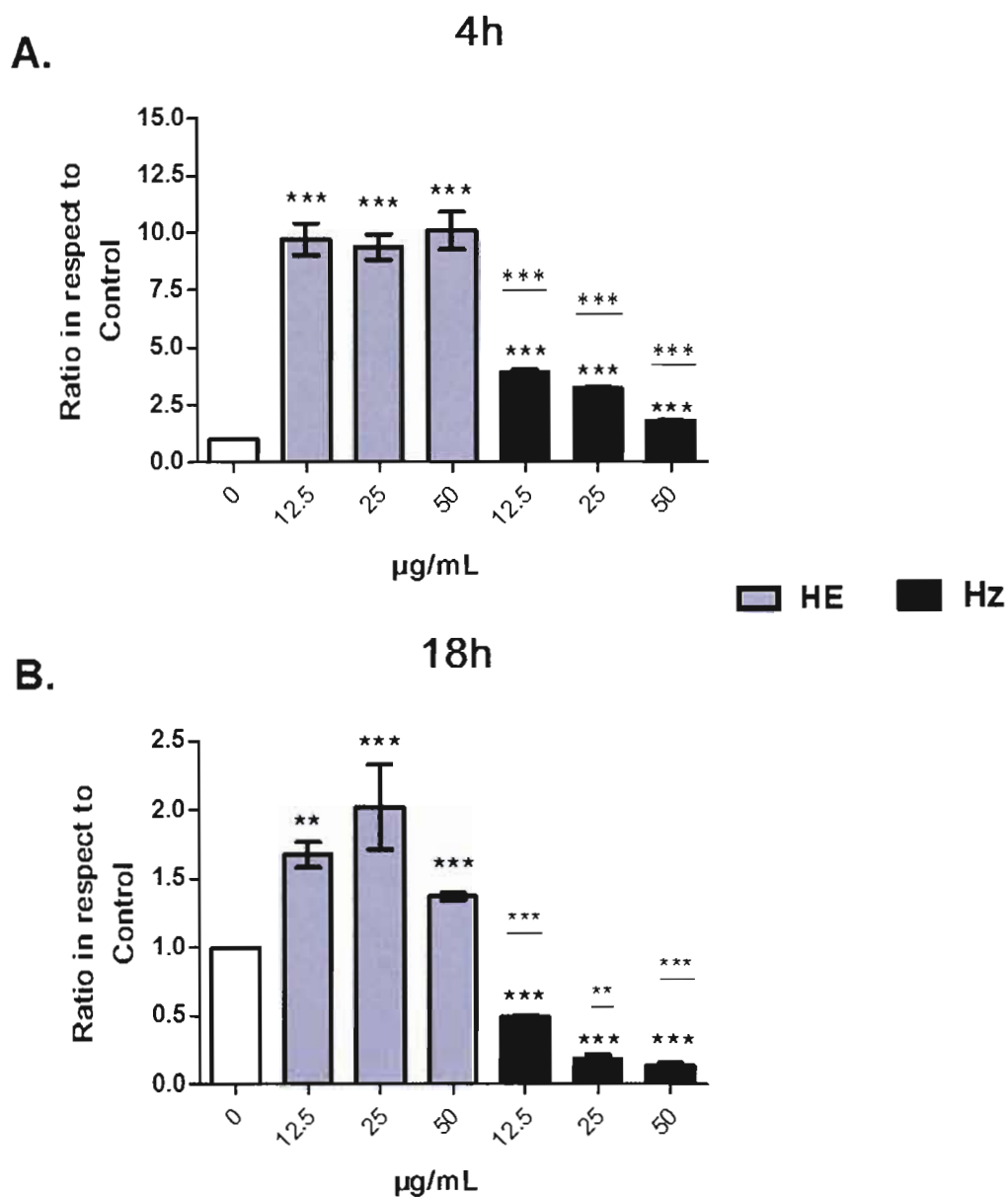
**Figure 3.3: IL-10 secretion in HE-conditioned BMDM is refractory to the inhibitory effects of IFN- $\gamma$**

BMDM ( $1.10^5$  cells/well) remained untreated (Ctrl) or were cultured in the presence of HE or HZ (25  $\mu$ g/ml) for 18 h after which the cells were stimulated with LPS (50 ng/ml) or primed with IFN $\gamma$  (100 units/ml) 15 min prior to LPS treatment. Twenty-four hours culture supernatants were harvested and assessed for IL-10 by ELISA. Error bars represent mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. IL-10 concentrations in culture supernatants were compared with a one-way ANOVA. Percentages of IL-10 inhibition induced by IFN- $\gamma$  and percentages of inhibition with respect to control BMDM are indicated by underlined numbers. \*\*\* $P$ <0.001; \*\* $P$ <0.01; \* $P$ <0.05.



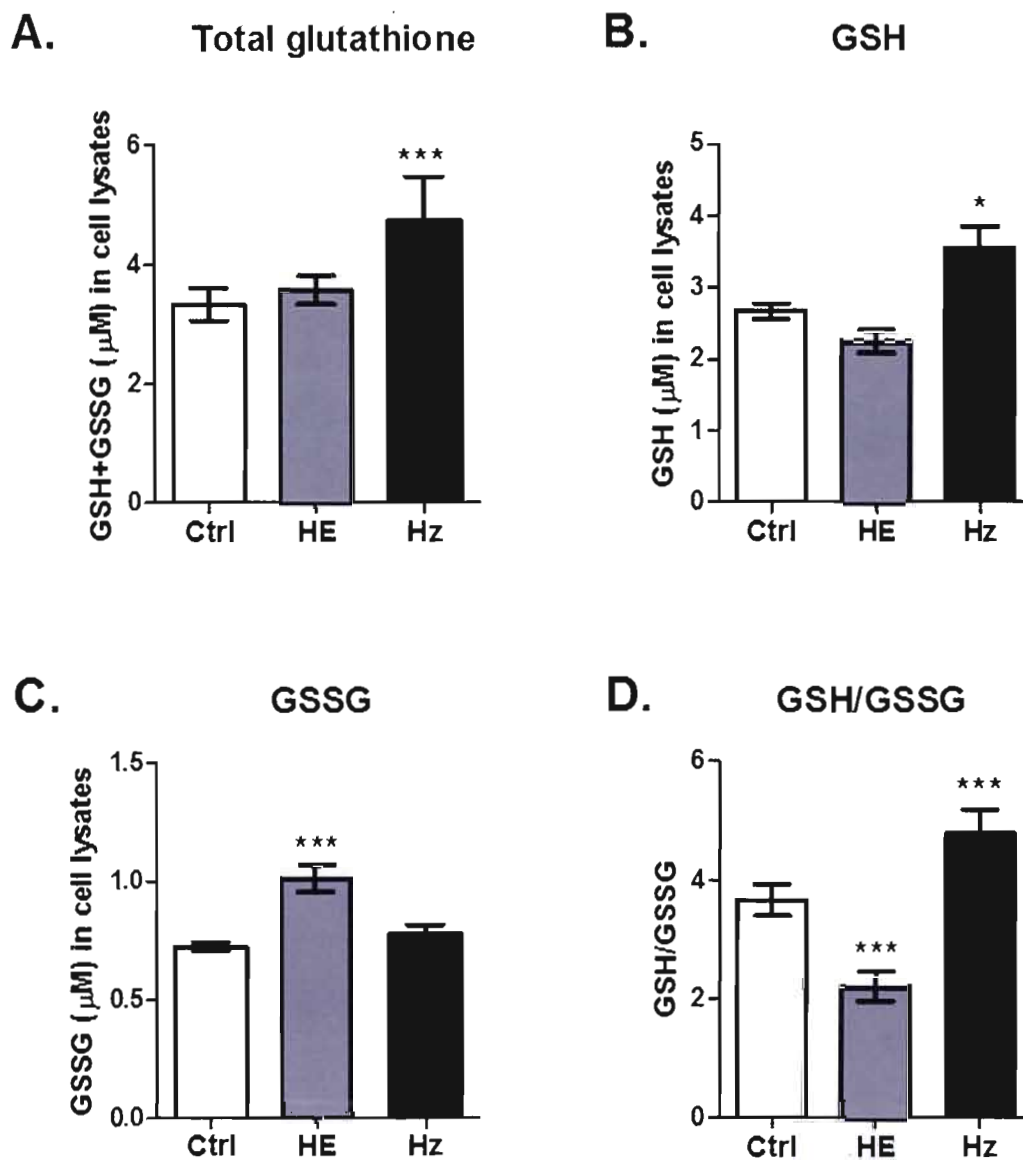
**Figure 3.4: Neutralization of IL-10 restores IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM**

BMDM ( $1.10^5$  cells/well) remained untreated (Ctrl) or were cultured in the presence of HE or HZ (25  $\mu$ g/ml) for 18 h and stimulated with LPS (50ng/ml) (A) or with IFN- $\gamma$  (100 units/ml) for 15 min prior to LPS stimulation (B). Anti-IL-10 neutralizing mAb or control isotype antibody (1  $\mu$ g/ml) was added to the culture medium 1 h before stimulation and 24 h culture supernatants were assessed for IL-12p70 content by ELISA. Error bars represent mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Percentages of inhibition with respect to controls are indicated by underlined numbers, and the effect of anti-IL-10 treatment on IL-12p70 concentrations was compared with a one-way ANOVA. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ .



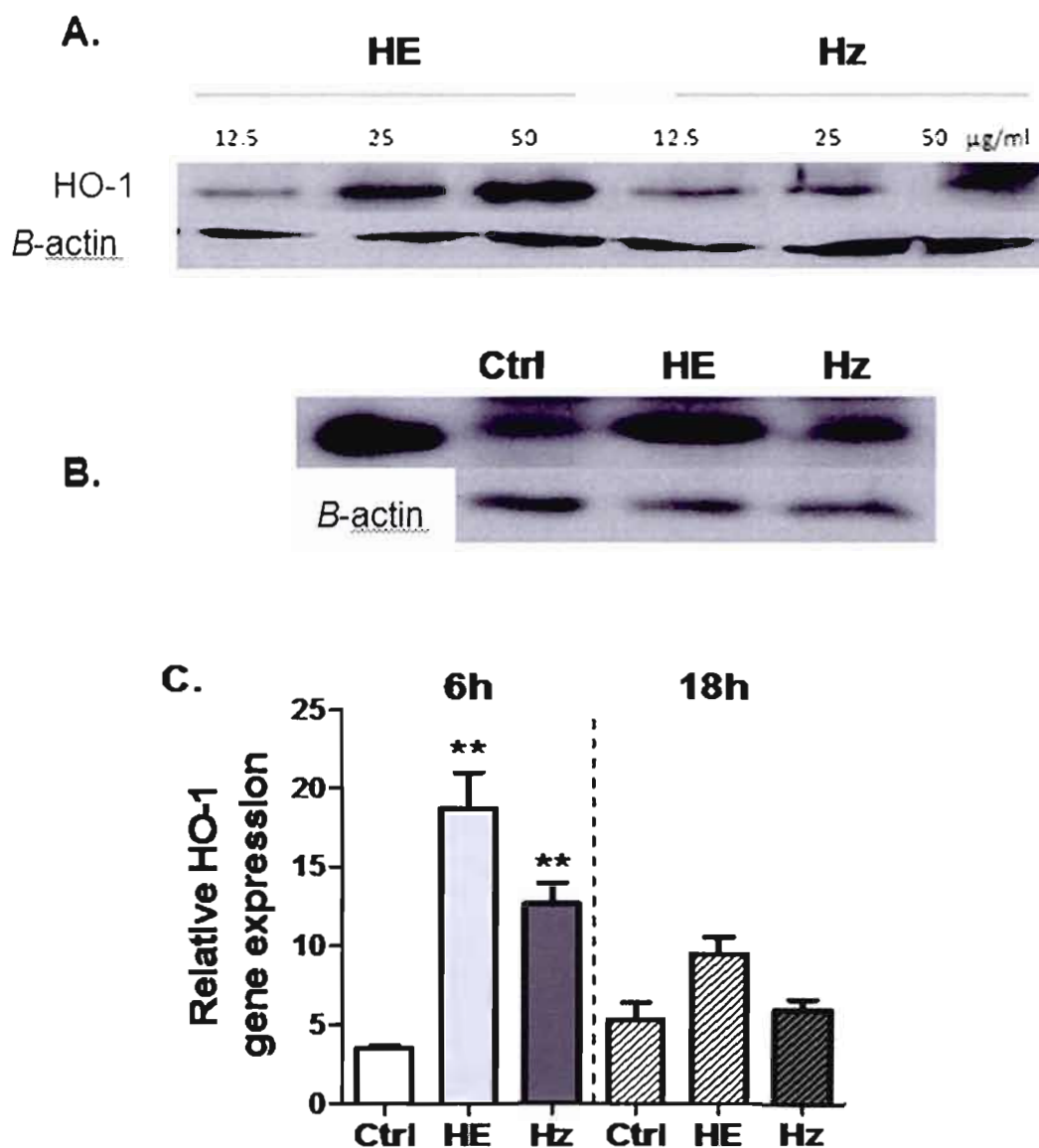
**Figure 3.5: ROS are generated after short-term and long-term exposure to HE**

BMDM ( $1.10^6$  cells/well) were incubated for 4 h (A) or 18 h (B) with HE or HZ (12.5-50 µg/ml) and then treated with  $H_2$ -DCFDA for estimation of ratios of mean channel fluorescence intensity with respect to control BMDM. Values were compared by one-way ANOVA \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ . Values from BMDM treated with equal HE/HZ concentrations were compared with a Student T test (underlined asterisks):  $P < 0.001$ .



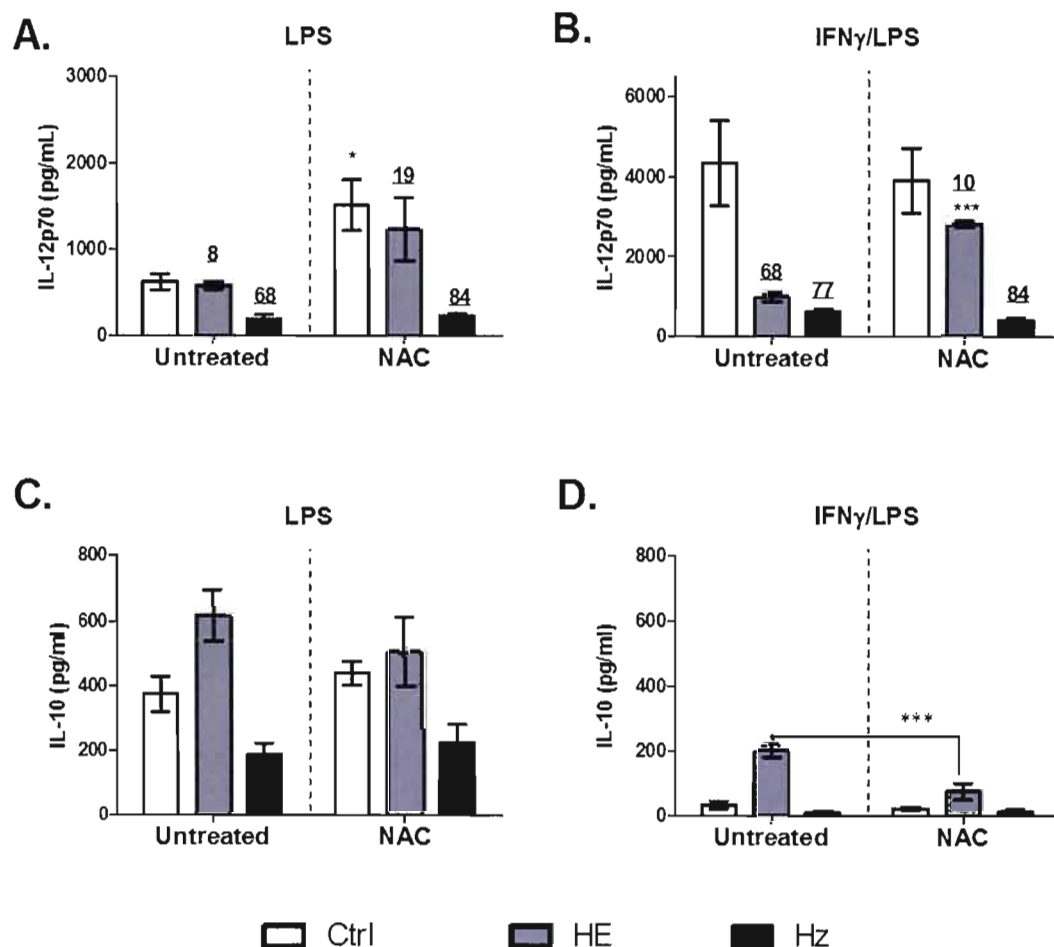
**Figure 3.6: HE decreases intracellular GSH/GSSG ratios in BMDM**

BMDM ( $2.10^6$  cells/well) were treated with HE or HZ ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) for 18 h after which cell lysates were deproteinated and assessed for intracellular levels of total glutathione (A), GSH (B) and GSSG (C). GSH/GSSG ratios were estimated accordingly (D). Error bars represent mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. A one-way ANOVA was used to compare values with respect to control (Ctrl) BMDM. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ .



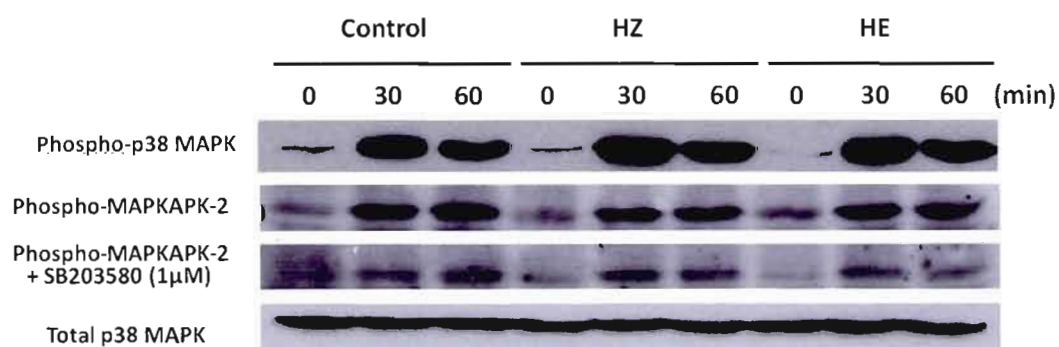
**Figure 3.7: HO-1 protein levels significantly increase after 6h exposure to HE**

BMDM ( $2.10^6$  cells/well) were treated with HE or HZ (12.5-50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 h (A) or for 18 h (25  $\mu\text{g/ml}$ ) (B) after which the culture supernatant was removed and the cells were lysed in equal volumes of Laemli-buffer. Proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and processed for detection using specific polyclonal antibodies to murine HO-1 or  $\beta$ -actin. Relative expression levels of HO-1 were normalized in respect to  $\beta$ -actin by densitometry, and data of four independent experiments was analyzed with a one-way ANOVA (C). \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 3.8: NAC restores IL-12p70 responses and decreases IL-10 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM**

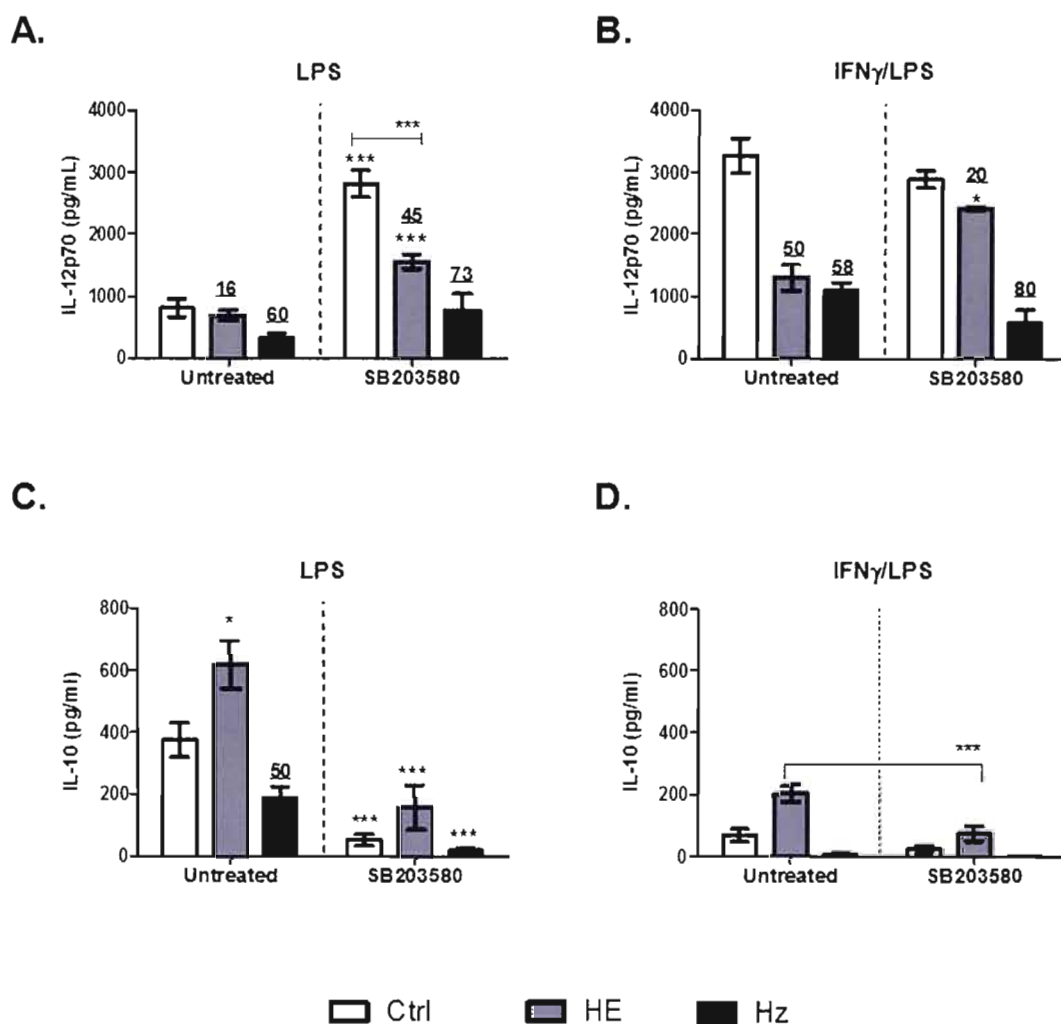
BMDM ( $1.10^5$  cells/well) remained untreated (Ctrl) or were cultured with HE or HZ (25  $\mu$ g/ml) for 18 h prior to LPS (A, C) or IFN- $\gamma$ /LPS (B, D) stimulation. NAC (0.25 mM) was added into the culture medium 1 h before stimulation. Twenty-four hour culture supernatants were harvested and assessed for IL-12p70 (A, B) and IL-10 content (C, D) by ELISA. Error bars represent mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. A one-way ANOVA was used to compare IL-12p70 and IL-10 values with respect to respective BMDM stimulated in absence of NAC. The percentage of inhibition on IL-12p70 responses with respect to controls (Ctrl) are indicated by underlined numbers. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ .



**Figure 3.9: SB203580 efficiently inhibits p38 MAPK activity in BMDM**

BMDM ( $4 \times 10^6$  cells/well) were treated with HE or HZ (25  $\mu\text{g/mL}$ ) for 18 h and stimulated with IFN- $\gamma$  (100 units/ml) and LPS (50 ng/ml) for 30 and 60 min. Proteins in total cell lysates were separated by SDS-PAGE and the levels of phospho-p38 MAPK, phospho-MAPKAPK-2 (in absence of, or with 1  $\mu\text{M}$  SB203580 pre-exposure for 1 h), and total p38 MAPK were revealed by Western Blot using specific monoclonal antibodies. Results are representative of two independent experiments.





**Figure 3.10: Inhibition of p38 MAPK restores IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS only in HE-conditioned BMDM**

BMDM ( $1.10^5$  cells/well) remained untreated (Ctrl) or were cultured in the presence of HE or HZ (25  $\mu$ g/ml) for 18 h and stimulated with LPS (50 ng/ml) (A, C) or pre-treated with IFN- $\gamma$  (100 units/ml) for 15 min prior to stimulation with LPS (B, D). SB203580 (1  $\mu$ M) was added into the culture medium 1 h before stimulation. Twenty-four hour culture supernatants were harvested and assessed for IL-12p70 (A, B) and IL-10 content (C, D) by ELISA. Error bars represent mean  $\pm$  SEM of four independent experiments; the percentages of inhibition with respect to control BMDM are indicated with underlined numbers. A one-way ANOVA was used to compare values with respect to BMDM in absence of SB203580 treatment. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ .

### 3.5. DISCUSSION

The interplay between IL-12 and IL-10 seems relevant for the control of malarial anaemia, as its severity is associated with low levels of the hematopoietic cytokine IL-12 (Chaisavaneeyakorn *et al.*, 2003; Chaiyaroj *et al.*, 2004; Casals-Pascual *et al.*, 2006), and high levels of IL-10 (Dodoo *et al.*, 2002; Lyke *et al.*, 2004; Ong'echa *et al.*, 2008), suggesting a direct detrimental inhibitory effect of IL-10 on IL-12 responses. However, several studies have reported elevated IL-10 levels in patients with uncomplicated malarial anaemia and a positive contribution by this cytokine in erythropoiesis homeostasis cannot be ruled out (Othoro *et al.*, 1999; Nussenblatt *et al.*, 2001; Lyke *et al.*, 2004; Ageely, Dawoud et Heiba, 2008; Ouma *et al.*, 2008).

*Plasmodium* infections are characterized by high haemolysis and elevated plasma levels of free heme. Heme is a harmful hydrophobic molecule that induces ROS once Fe is released in response to HO-1 activity or oxidative degradation (Tenhunen, Marver et Schmid, 1968). In addition, free heme promotes the recruitment and activation of neutrophils which further contribute to superoxide production and oxidative damage (Porto *et al.*, 2007). Herein, the possible implications for free heme in malaria dyserythropoiesis were investigated by assessing the regulatory effects of HE on IL-12 and IL-10 responses in BMDM.

We hypothesized that HE would modulate IL-12 and IL-10 responses by altering the redox status in MP as described for diesel exhaust particles (Yin *et al.*, 2004). Indeed, low levels of reduced GSH may down-regulate IL-12 production and favour IL-10 responses (Murata, Shimamura et Hamuro, 2002). Moreover, the priming effect of IFN- $\gamma$  on IL-12p70 production requires elevated GSH/GSSG ratios in human monocytes (Utsugi *et al.*, 2002). Our data associates oxidant properties with HE, characterized by robust ROS responses and enhanced intracellular levels of GSSG, which persist despite the induction of HO-1. While ROS can affect signalling pathways, they may also promote oxidative damages. The most reactive ROS are hydroxyl radicals (half life: nanoseconds) followed by superoxide ions (half life: microseconds), peroxynitrites (half life: milliseconds), NO (half life: seconds) and

hydrogen peroxides (half life: minutes)(Kehrer, 2000; Salganik, 2001; Kohen et Nyska, 2002).

HE has important inhibitory effects on the priming of IL-12p70 responses to LPS by IFN- $\gamma$  and this inhibition associates both with decreases in IL-12p40 and IL-12p35 mRNA levels and enhanced IL-10 responses. These results suggest that this inhibition is consequent to the fact that HE-conditioned BMDM are rendered insensitive to the inhibitory effects of IFN- $\gamma$  on IL-10 responses. In this context, HE may possibly interfere with activation of the glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), an enzyme known to repress the activity of the transcriptional factors AP-1 and c-AMP response element-binding (CREB), required for IL-10 gene expression (Hu *et al.*, 2006). In addition, since secretion of IL-12p40 is minimally affected by HE, we also assume that its inhibitory effect on IL-12p35 gene transcription is the limiting factor for production of bioactive IL-12p70. This assumption is further corroborated by the fact that IL-12p40 gene expression and secretion is known to largely exceed IL-12p70 levels and that post-transcriptional control of gene expression may be induced by IL-10 in murine MP (Bogdan *et al.*, 1992; Aste-Amezaga *et al.*, 1998).

Taken together, our results suggest that free heme may contribute to malarial anaemia by inhibiting IL-12p70 responses and limiting its beneficial effects on erythropoiesis. As administration of IL-12 has shown major stimulatory effects on erythropoiesis in IFN- $\gamma$  deficient mice, a beneficial effect for free heme on erythropoiesis cannot be excluded. It is possible that IFN- $\gamma$  may exert detrimental effects on erythropoiesis, i.e., by down-regulating the production of anti-inflammatory IL-10. Thus, by rendering MP refractory to the inhibitory effects of IFN- $\gamma$  on IL-10 responses, free heme may also contribute to decreased TNF- $\alpha$  production (Kontoyiannis *et al.*, 2001; Denys *et al.*, 2002) which is a major player in malarial dyserythropoiesis (Felli *et al.*, 2005; Buck *et al.*, 2008). Indeed, HE significantly inhibits TNF- $\alpha$  responses to IFN- $\gamma$ /LPS in BMDM (data not shown), an effect that has been corroborated in the human monocytic cell line THP-1 (Silver, Hamilton et Toossi, 1997).

A collateral observation in our study concerns the detrimental effect that Hz has on IL-10 responses in BMDM, which contrasts with the stimulatory effects measured in human PBMC, which have been linked to the inhibition of IL-12p40 gene expression and to

impaired IL-12p70 responses (Keller *et al.*, 2006). In this context, we also measured over-production of IL-10 and impaired IL-12p70 responses to LPS and IFN- $\gamma$ /LPS in murine peritoneal exudates cells pre-conditioned with HZ (data not shown), which may suggest functional differences between BMDM and peritoneal MP/PBMC. However, when using total cell exudates, the contribution of other cells (T cells and B cells) in the IL-10 response cannot be excluded. As accumulation of HZ in intervillous blood mononuclear cells (IBMC) correlates with impaired IL-10 and TNF- $\alpha$  responses during natural infection (Perkins *et al.*, 2003), we suggest that the regulatory effects of HZ on cytokines may indeed differ among cell types, and the anti-oxidant defences of target cells may contribute to the reported variability. In agreement with our data, the deficient IL-12 response measured in peritoneal MP from *Pb*-infected mice, which may involve both the activities of HE and HZ, is not efficiently reverted by *in vitro* neutralization of IL-10 compared with the enhanced response measured in control MP treated similarly (Xu *et al.*, 2001). As HZ impairs both IL-12p70 and IL-10 responses to LPS, it may possibly affect an early event in TLR signalling. In this context, by increasing GSH/GSSG ratios and hampering ROS responses in BMDM, HZ may affect the activity of the NADPH oxidase complex, as has been observed in human monocyte-derived MP (Schwarzer et Arese, 1996). Direct interaction of NADPH oxidase with TLR4 is required for LPS-dependent ROS generation and concomitant activation of NF $\kappa$ B (Park *et al.*, 2004), highlighting the possibility for long-term treatment with HZ to interfere with NF $\kappa$ B ROS-dependent signalling.

Although inhibition of the p38 MAPK enhanced IL-12p40 responses to LPS in HE- and HZ-conditioned BMDM (data not shown), it had a major stimulatory effect on IL-12p70 responses to LPS in control BMDM. A comparable effect was measured in response to NAC, for which this reducing agent also had minor stimulatory effects on IL-12p70 responses to LPS in HE-treated cells compared with control BMDM, but significantly restored these responses in HE-conditioned BMDM stimulated with IFN- $\gamma$ /LPS. The significance of these differences remains to be investigated, but it is tempting to speculate that HE may up-regulate IL-10 responses in LPS-stimulated cells, partially through a p38 MAPK-independent mechanism.

In conclusion, our data strongly suggest that HE inhibits IL-12p70 responses, partially through a redox-dependent mechanism that sustains IL-10 responses, despite the presence of IFN- $\gamma$ , and which in contrast to oxidants such as diesel exhaust particles, does not rely on modulation of IL-12p40 gene expression (Ohtani *et al.*, 2005). The impact of these effects on erythropoiesis *in vivo* remains to be evaluated, as HE stimulates the development of early stage erythroid precursors *in vitro* (Monette et Holden, 1982). In addition, the relative contributions of HE and HZ in dyserythropoiesis may also depend on their mechanism of entry into MP and on their interaction with hematopoietic precursors. HZ is readily phagocytosed and accumulates rapidly in MP, also interacting with cell membranes (Schwarzer *et al.*, 1999). On the other hand, HE is an amphipathic molecule with high affinity with cell membranes, binding to lipoproteins in plasma, including LDL which may represent a relevant additional entrance to MP *in vivo* (Camejo *et al.*, 1998). Thus, HZ and HE might not interact in comparable amounts with MP *in vivo*. Finally, due to its affinity with membranes, it is possible that HE may alter the function of cells other than phagocytes, such as T and B cells, which contribute to the systemic cytokine response in malaria.

# **CHAPITRE IV**

## **ROBUST ERYTHROPHAGOCYTOSIS LEADS TO MACROPHAGE APOPTOSIS VIA A HEMIN- MEDIATED REDOX IMBALANCE: ROLE IN HAEMOLYTIC DISORDERS**

*Mathieu Cambos\* and Tatiana Scorza\*.*

*\*Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montreal, Montreal, Quebec,  
Canada.*

Ce chapitre, présenté sous forme d'article scientifique, a été accepté pour publication dans la revue « Journal of Leukocyte Biology » le 3 septembre 2010 et a nécessité l'implication du Pr. T. Scorza et de l'auteur de cette thèse (M. Cambos). Toutes les expériences présentées dans cet article ont été réalisées par M. Cambos. La rédaction du manuscrit a été réalisée par M. Cambos en concertation avec le Pr. T. Scorza et en tenant compte des commentaires judicieux du Pr R. Moreau et de Mr C. Bleau. T. Scorza a aussi contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant le support financier nécessaire et son expertise scientifique avisée. Pour des raisons écologiques et d'économie de papier, les références cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

#### 4.1. ABSTRACT

MP from the reticuloendothelial system (RES) are responsible for the clearance of senescent RBC. Although the frequency of senescent RBC is low under steady-state conditions, it increases dramatically during haemolytic disorders, resulting in enhanced erythrophagocytosis. As erythrophagocytosis has been involved in MP dysfunction and as certain haemolytic disorders associate to MP apoptosis, a possible link between erythrophagocytosis and the viability of phagocytes was investigated herein. To mimic haemolytic disorders, two distinct *in vitro* models, artificially oxidized RBC and RBC from *PcaDS*-infected mice (DSRBC), were chosen to study the erythrophagocytosis impact on the viability of J774A.1 MP. Although control RBC (CRBC) were weakly phagocytised and did not affect MP viability significantly, erythrophagocytosis of oxidized RBC and DSRBC was robust and resulted in a sharp decrease of MP viability via apoptosis. Under these conditions, Hb-derived HE was shown to be involved in the induction of apoptosis. Moreover, oxidized RBC, DSRBC, and HE generated ROS species, which were responsible for the apoptosis of MP. Furthermore, HO-1, strongly induced in response to treatment with oxidized RBC, DSRBC, or HE, was shown to protect MP partially against apoptosis, suggesting that robust erythrophagocytosis may exceed the detoxification capabilities of MP. Taken together, these results suggest that enhanced erythrophagocytosis associated to haemolytic disorders leads to MP apoptosis *in vitro* and may have critical implications for the control of malaria infection and for the exacerbated susceptibility to bacterial infections during haemolytic disorders.

## 4.2. INTRODUCTION

The RES is composed of phagocytic cells, mostly MP, located in various tissues/organs, such as blood, bone marrow, liver, and spleen (Wooles et Diluzio, 1963; Saba, 1970). RES MP are involved in the recognition and destruction of blood-borne pathogens (Wooles et Diluzio, 1963; Singer, 1973) and are also responsible for the clearance of damaged cells (Tanaka, 2005). In this respect, RES MP continuously remove senescent RBC from the peripheral circulation (Saxena et Khandelwal, 2009), a process that essentially takes place in the red pulp splenic sinuses (Mebius et Kraal, 2005; Khatib, Rabah et Sarnaik, 2009). Under steady-state conditions, senescent RBC represent only 1% of the total RBC pool in human and 2% in mice (Saxena et Khandelwal, 2009). However, during certain pathologies, referred to as haemolytic disorders, the proportion of senescent RBC increases drastically and results in enhanced erythrophagocytosis (Hebbel, 1991; Chang et Stevenson, 2004).

Sickle cell anaemia and thalassemia are characterized by Hb abnormalities leading to the deposition of HE on RBC membranes, to lipid peroxidation and to the premature aging of RBC (Browne *et al.*, 1997; Browne, Shalev et Hebbel, 1998). Similarly, blood colonization by *Plasmodium* parasites promotes oxidation and alteration of uninfected and infected RBC membranes (Omodeo-Sale *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Chang et Stevenson, 2004). Modifications of RBC membranes associated to haemolytic disorders decrease their deformability, promoting antibody/complement fixation, disturbing membrane asymmetry, and leading to the premature clearance of RBC by RES MP (Hebbel, 1991; Turrini *et al.*, 1992; Dondorp *et al.*, 1999). As these membrane modifications affect a large proportion of RBC, haemolytic disorders associate to robust erythrophagocytosis and anaemia (Hebbel, 1991; Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000; Chang et Stevenson, 2004).

*In vitro* studies report inhibition of the phagocytic activity, the oxidative burst in response to PMA, and the antibacterial functions of MP subjected to erythrophagocytosis, artificially enhanced by RBC oxidation or antibody-dependent opsonisation (Commins, Loegering et Gudewicz, 1990; Loegering *et al.*, 1996). Comparable observations have been described when *Plasmodium*-infected RBC are used (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Schwarzer *et al.*, 1992). Taken together, these data suggest that robust erythrophagocytosis



interferes with MP functions, which led us to investigate the effect of RBC phagocytosis on MP viability. The apoptosis of MP described during *Plasmodium* infection (Toure-Balde *et al.*, 1996; Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000) and the enhanced susceptibility to bacterial infections in patients with malaria and other haemolytic disorders tend to support this hypothesis (Kaye et Hook, 1963; Loegering *et al.*, 1987; Mabey, Brown et Greenwood, 1987).

To investigate a possible correlation between enhanced erythrophagocytosis and reduced MP viability, RBC were artificially oxidized to enhance their uptake by J774A.1 MP. In parallel, a more physiological approach was conducted using DSRBC. Both models revealed that a reduction in MP viability and an increase in apoptosis are induced when large amounts of RBC are ingested. Furthermore, we demonstrate that Hb-derived free heme is involved in MP apoptosis, partially through a redox-dependent mechanism.

## 4.3. MATERIALS AND METHODS

### 4.3.1. Reagents

Otherwise stated, reagents were purchased from Sigma Chemical Co., Fluka (Oakville, ON, Canada). RPMI, PBS, and fetal bovine serum (FBS) were from Hyclone (Waltham, MA, USA). Penicillin/streptomycin was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). A stock solution of HE chloride (Sigma Chemical Co., Fluka) at 25 mg/mL was prepared by dissolving HE in 100 mM NaOH. NaOH did not induce MP apoptosis at the concentration used in this study (data not shown). A stock solution of human Hb (Sigma Chemical Co., Fluka) at 10 mg/mL was prepared by dissolving Hb in complete medium (CM) (RPMI containing 2 mM L-glutamine, 10% FBS, and penicillin/streptomycin).

### 4.3.2. Mice, infections, and blood recovery

Six- to 8-week-old female BALB/c mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) were infected with  $10^5$  DSRBC by the i.p. route. *PcaDS* parasites induce parasitemia of 40–60% after 8–9 days. Parasitemia was monitored daily on Giemsa-stained blood smears. For *in vitro* studies using DSRBC, blood was collected from isoflurane (Pharmaceutical Partners of Canada, Richmond Hill, ON, Canada)-anesthetised mice by cardiac puncture in heparinised (20 µg/mL) PBS when parasitemia was 40%. RBC were then washed three times in cold PBS (1200 rpm, 10 min), counted, and added to MP at different MP:RBC ratios. Blood from control mice was processed identically. All mice used in this study were housed and handled in accordance with procedures approved by the Animal Care Committee of the Université du Québec à Montréal (Montreal, Canada; Protocol 562-R3-0510).

#### 4.3.3. Oxidation of CRBC

RBC were oxidized as described elsewhere to enhance their phagocytosis by J774A.1 MP [25]. Briefly, RBC were treated with oxidation buffer (0.4 mM CuSO<sub>4</sub> and 5 mM L-ascorbate in PBS) for 5–10 min at 37°C at a 4% hematocrit. Oxidized RBC were then washed twice with 0.2% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) PBS and twice with PBS.

#### 4.3.4. Preparation of RBC ghosts

Ghosts from DSRBC and oxidized RBC were generated following a standard procedure (Steck et Kant, 1974; Chiang, Alkan et Beachey, 1979) with minor modifications to preserve the integrity of RBC membranes (Wunderlich *et al.*, 1987; Millington *et al.*, 2006). Briefly, DSRBC and oxidized RBC were washed three times in PBS and washed once in PBS containing 113 mM glucose and 3% FBS. Thirty volumes of cold 5 mM sodium phosphate buffer (pH 8) (5P8 buffer) containing 1 mM EDTA, 0.2 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, 2 mM β-mercaptoethanol (β-ME), 5 μg/mL leupeptin, and 0.01% of NaN<sub>3</sub> was added, and RBC were kept on ice for 10 min. Cells were then centrifuged at 20,000 rpm for 20 min, and the pellets were washed extensively, first with 5P8 and then with PBS to remove the remaining Hb. After treatment, ghosts were shown to contain 5–10% of their original Hb content (data not shown). Confocal microscopy analysis revealed that ghosts retained their membrane integrity following osmotic lysis (data not shown).

#### 4.3.5. Culture and treatments of J774A.1 MP

J774A.1 MP (TIB-67; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in CM at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Cells (0.5.10<sup>6</sup> cells/mL, 500 μl) were seeded 24 h prior to the experiments in 48-well tissue culture-treated plates (Corning, Lowell, MA, USA). The day of the experiment, J774A.1 MP culture medium was replaced by fresh CM, and cells were incubated with various ratios of DSRBC, CRBC, and oxidized RBC (MP:RBC ratios ranging from 1:25 to 1:200) or with various concentrations of Hb (1–4 mg/mL) or HE (25–

400  $\mu\text{g/mL}$ ). Analyses were performed after 6, 24, or 48 h of incubation, depending on experiments. In certain experiments, zinc protoporphyrin IX (ZnPPiX) and reduced GSH were added to MP cultures 1–2 h prior to treatment with RBC, Hb, or HE. For transwell experiments, MP were seeded in the wells, and RBC were added to the inserts (0.4  $\mu\text{M}$  pore size polyester membrane transwell plate, Corning).

Following treatment with CRBC, DSRBC, or oxidized RBC, J774A.1 MP were subjected to ammonium chloride lysis to remove non-internalized RBC (untreated counterparts were treated as well). Briefly, J774A.1 MP samples were recovered in cold PBS, centrifuged (1200 rpm, 10 min), and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  RBC lysing buffer (Sigma Chemical Co., Fluka) for 5 min on ice with occasional shaking. J774A.1 MP were then washed twice with cold PBS prior to further analysis. After treatments with Hb or HE, J774A.1 MP samples were recovered and washed twice in cold PBS prior to further analysis.

#### 4.3.6. FACS analysis

Flow cytometry experiments were performed using a FACSCalibur (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). For each sample, 50,000–100,000 cells were acquired. Analysis was performed using the WinMDI program (2.9 version).

#### 4.3.7. Annexin-V/PI staining

J774A.1 MP were washed once with calcium buffer ( $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, NaCl 140 mM, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 10 mM, and  $\text{NaN}_3$  0.02% in  $\text{dH}_2\text{O}$ ), resuspended in 100  $\mu\text{L}$  calcium buffer containing 2.5  $\mu\text{L}$  Annexin-V-APC (Invitrogen) and propidium iodide (PI) at 10  $\mu\text{g/mL}$ , and incubated at room temperature for 15 min. Cells were then washed once with calcium buffer and analyzed by flow cytometry. Viable cells were defined as Annexin-V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> cells (see Fig. 4.2.A, Gate R1), early apoptotic cells as Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (as well as Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>dull</sup>; see Fig. 4.2.A, Gate R2), and late apoptotic and necrotic cells as Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> (see Fig. 4.2.A, Gate R3). Percentage of reduction in viability was calculated as follows:

percent viability reduction =  $\{1 - [(\% \text{ viable-treated MP}) / (\% \text{ viable control MP})]\} \times 100$

#### 4.3.8. TUNEL assay

The Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) assay was performed following the manufacturer's instructions (In Situ cell death detection kit fluorescein, Roche, Laval, QC, Canada). Briefly, cells were fixed in fresh 2% paraformaldehyde PBS for 60 min at room temperature. Following two additional washes in PBS, cells were incubated in permeabilization buffer (0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate) for 3 min on ice. Cells were then washed and incubated in TUNEL labelling solution for 60 min at 37°C and washed once with PBS prior to flow cytometry analysis. In certain experiments, camptothecin (25 µg/mL) was added 18 h before analysis as a positive control for apoptosis.

#### 4.3.9. Hoechst 33258/PI staining

J774A.1 MP were resuspended at  $1.10^6$  cells/mL in PBS. Cells were treated with Hoechst 33258 at 10 µg/mL for 10 min at 37°C, after which, PI was added at 10 µg/mL, and incubation was continued further for 10 min. Hoechst/PI staining was then evaluated by fluorescence microscopy (Eclipse Ti-S, Nikon, Montréal, QC, Canada) on cytopspin preparations (Shandon Cytospin 2, Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada), embedded in mounting medium for fluorescent microscopy (Kierkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA).

#### 4.3.10. DNA fragmentation analysis on agarose gel

J774A.1 MP ( $4.10^6$  cells) were lysed in 500 µL 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2% Triton X-100, 10 mM EDTA. Samples were incubated for 30 min on ice and centrifuged (15,000 rpm, 20 min, 4°C), and supernatants were recovered and treated with DNase-free RNase A (100 µg/mL) for 1 h at 37°C (Fermentas, Burlington, VT, USA). Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted twice with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol

mixture (25:24:1) and once with chloroform. After addition of 25  $\mu$ L 5 M NaCl, DNA was precipitated overnight ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) with 2.5 vol ice-cold ethanol. The DNA pellet was then dissolved in 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), and incubated for 15 min at  $45^{\circ}\text{C}$ , after which, samples were mixed with loading buffer (Invitrogen) and resolved in a 2% agarose gel along with a DNA ladder (FastRuler low-range DNA ladder, Fermentas; Owl separation system, Model B1A, Thermo Scientific Owl, Portsmouth, NH, USA). The agarose gel was stained with ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Tris-acetate-EDTA buffer), and DNA was visualized with ultraviolet-light illumination (AlphaMager, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). When stated, camptothecin (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added 18 h before analysis as a positive control for apoptosis. A similar amount of total DNA was used in each sample.

#### **4.3.11. CFSE staining of RBC and quantification of erythrophagocytosis**

RBC were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) following a modified protocol (Cell Trace CFSE proliferation kit, Invitrogen). Cells at  $2 \times 10^7$  cells/mL were incubated in CFSE staining buffer (PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 2.5  $\mu\text{M}$  CFSE) for 10 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The reaction was blocked with CM for 10 min on ice, after which, RBC were washed three times with an excess of RPMI. Flow cytometry revealed homogeneous and reproducible staining of RBC. In all experiments, CRBC, DSRBC, as well as oxidized RBC showed similar CFSE fluorescence intensities. For confocal microscopy experiments, J774A.1 MP were cultured in the Lab-Tek chamber slide system (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA), and non-internalized RBC were washed with PBS prior to analysis (confocal microscope, BioRad MRC-1024 ES, Eclipse PE-300, Nikon). For Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) experiments, J774A.1 MP samples were subjected to ammonium chloride lysis to remove non-internalized RBC prior to analysis. The percentages of MP having phagocytised at least one RBC were determined with the Gate M1 (see Fig. 4.1.A), which considers CFSE<sup>+</sup> MP. MP mean phagocytic activity was estimated as CFSE mean fluorescence intensity (MFI).

#### 4.3.12. H<sub>2</sub>-DCFDA staining of J774A.1 MP to quantify ROS production

J774A.1 MP were stained with warm, freshly prepared PBS containing 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>-DCFDA (Invitrogen) for 30 min at 37°C and washed and incubated in RPMI containing no phenol red for 30 min at 37°C. Prior to FACS acquisition, cells were stained with 7-amino-actinomycin D (10  $\mu$ g/mL) to exclude dead cells from analysis. Cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) for 15 min prior to FACS analysis as a positive control for oxidation.

#### 4.3.13. Measurement of intracellular HE accumulation

J774A.1 MP samples were subjected to ammonium chloride lysis to completely remove non-internalized RBC. Cells were then lysed by three freeze/thaw cycles and briefly sonicated (three pulses of 1 s; efficiency: 70%; UP50H ultrasonic homogenizer, Hielscher USA, Ringwood, NJ, USA) to scatter membranes. HE was measured using a standard protocol taking advantage of HE-elicited luminescence (Schwarzer, Turrini et Arese, 1994; Scorza *et al.*, 1999). Briefly, 30  $\mu$ L samples (containing 3–6.10<sup>6</sup> cell/mL) were added to an opaque 96-well plate (Optiplate 96 white, Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) and analyzed with a luminescence reader (MLX microtiter plate luminometer with the software Revelation MLX, Version 4.27, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA), set to dispense simultaneously 100  $\mu$ l luminol/NaOH solution (1  $\mu$ g/ml luminol dissolved in a solution containing 0.1 M NaOH and 3 mM EDTA) and 100  $\mu$ l t-buthylhydroperoxide/NaOH solution (7.26 mM t-buthylhydroperoxide dissolved in a solution containing 0.1 M NaOH and 3 mM EDTA) to each well. Luminescence output was measured immediately for a 2s interval. A standard curve was made using HE chloride (Sigma Chemical Co., Fluka) to express results in pg HE/cell.

#### 4.3.14. Western blot analysis of HO-1 expression

Cells were lysed for 30 min on ice in buffer containing 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 275 mM NaCl, 20% glycerol (v/v), 2% IGEPAL, 1 mM PMSF, 20  $\mu$ g/mL aprotinin, 20  $\mu$ g/mL leupeptin, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 50 mM NaF. Lysates were then centrifuged (13,000 rpm, 15

min), and the supernatants were stored at -80°C. Supernatant protein concentrations were quantified by the Lowry assay (DC protein assay, BioRad, Mississauga, ON, Canada). Aliquots of supernatant (2.5–5 µg/lane) were subjected to SDS-PAGE, and the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were blocked in SuperBlock blocking buffer (Thermo Scientific) for 1 h, washed with TBS/0.1% Tween 20, and incubated with anti-HO-1 polyclonal antibody (pAb) (SPA894; Assay Designs, Ann Harbor, MI, USA) following the manufacturer's instructions. Membranes were then washed and incubated with anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody. Proteins were visualized using SuperSignal West pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific).  $\beta$ -actin was quantified using an anti- $\beta$ -actin antibody (clone 2F1-1, BioLegend, San Diego, CA, USA) in combination with a biotinylated antimouse Ig antibody (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and a streptavidin HRP conjugate (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

#### **4.3.15. Statistical analysis**

Statistical analysis used the GraphPad Prism 5 software for ANOVA (Tukey multiple comparison method), using compiled data from three to four independent experiments. Otherwise stated, statistical analysis compared the different assay conditions with control counterparts. Results are representative of repeated or combined experiments. Values represent mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least triplicates.



## 4.4. RESULTS

### 4.4.1. Sustained phagocytosis of oxidized RBC and DSRBC decreases the viability of J774A.1 MP

To evaluate the impact of robust erythrophagocytosis on MP viability, two distinct *in vitro* models were used. First, RBC were oxidized artificially by a  $\text{CuSO}_4$ /ascorbate treatment to alter their plasma membrane and enhance their phagocytosis by J774A.1 MP. This treatment promotes membrane lipids/proteins oxidation, leading to Band-3 clustering as well as phosphatidylserine externalization, enhancing RBC recognition by MP (Lutz *et al.*, 1988; Mandal *et al.*, 2002). A more physiological approach, leading to similar membrane alterations as these described in oxidised RBC, using RBC from *Pca*DS-infected mice with 40% parasitemia was included. As described previously, *Plasmodium* infections associate to inflammation and oxidative stress, which is responsible for alterations as well as opsonization of RBC membranes, leading to an enhanced uptake of RBC by MP (Chang et Stevenson, 2004). Elimination of both oxidized RBC and RBC from *Pca* DS-infected mice by MP mainly involve complement receptors, Fc receptors and CD36 (Lutz *et al.*, 1988; Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Turrini *et al.*, 1992; Das et Nanda, 1999; Omodeo-Sale *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Chang et Stevenson, 2004). Flow cytometry analysis revealed that CRBC are poorly ingested by J774A.1 MP (Fig. 4.1.A–D), in accordance with the fact that the frequency of senescent RBC is relatively low under steady-state conditions (Saxena et Khandelwal, 2009). In contrast, oxidized RBC and DSRBC were taken up in large amounts (Fig. 4.1.A–D). On average, five to 10 times more oxidized RBC and DSRBC were ingested in comparison with CRBC. Confocal microscopy experiments ascertained that oxidized RBC and DSRBC were internalized and not solely attached to the MP membrane (Fig. 4.1.D).

Annexin-V/PI staining revealed that 48 h treatment with oxidized RBC or DSRBC resulted in dose-dependent increases in apoptotic and/or necrotic J774A.1 MP (Fig. 4.2.A–C). In contrast, the viability of MP treated with CRBC was not affected significantly (Fig. 4.2.D). Taken together, our results suggest that under conditions of low RBC phagocytosis,

the viability of MP is not compromised, but if the proportion of senescent RBC increases, robust erythrophagocytosis results in loss of MP viability.

#### **4.4.2. Oxidized RBC and DSRBC induce the death of J774A.1 MP through apoptosis**

To determine whether oxidized RBC and DSRBC induced MP cell death through apoptosis, additional cell viability assays were performed. Breaks in DNA as well as DNA laddering, two hallmarks of apoptosis, were evaluated in MP treated with oxidized RBC or DSRBC for 48 h. The TUNEL assay revealed a significant increase in MP harboring breaks in DNA (TUNEL<sup>+</sup> cells) in response to ingestion of oxidized RBC and DSRBC (Fig. 4.3.A and B). In addition, characteristic apoptotic DNA laddering profiles were observed in these cells (Fig. 4.3.C and D). Confocal microscopy analysis of MP treated with DSRBC and stained with Hoechst/PI revealed DNA condensation characteristic of apoptotic cell death (Fig. 4.3.E). Taken together, these results demonstrate that oxidized RBC and DSRBC induce MP death through apoptosis.

#### **4.4.3. Induction of apoptosis requires cell-to-cell contact between RBC and J774A.1 MP**

As oxidized RBC and DSRBC were ingested efficiently by MP, the requirement of cell-to-cell contact and phagocytosis for the induction of apoptosis was assessed. RBC and J774A.1 were co-cultured in transwells to prevent cellular contact without interfering with the exchange of soluble factors. As depicted in Fig. 4.4.A, when J774A.1 MP and oxidized RBC were physically separated in transwells, induction of apoptosis was abrogated almost completely. Similar results were obtained with DSRBC (Fig. 4.4.B). These results indicate that induction of apoptosis requires cell-to-cell contact and does not depend on the secretion of soluble factors by RBC. In addition, our study (Fig. 4.1.D) and several others have shown that oxidized RBC (Lutz *et al.*, 1988; Sambrano, Parthasarathy et Steinberg, 1994; Tanaka, Usui et Kojo, 2001) as well as RBC from *Plasmodium*-infected mice (Turrini *et al.*, 1992) are phagocytised by MP, suggesting the implication of RBC ingestion in the induction of apoptosis.

#### 4.4.4. Ingestion of Hb following oxidized RBC and DSRBC phagocytosis is responsible for the induction of J774A.1 MP apoptosis

Preliminary experiments revealed that 48 h conditioned medium from J774A.1 MP treated with DSRBC (ratio 1:100 – 1:400) failed to induce MP apoptosis, suggesting that the decrease in cell viability is not mediated by a MP-derived soluble factor (data not shown). Therefore, we hypothesized that the sharp drop in J774A.1 MP viability was consequent to the ingestion of DSRBC. In addition, the fact that oxidized RBC (free of any *Plasmodium*-related compounds) and DSRBC were able to induce MP apoptosis suggests that the responsible pro-apoptotic factors are common components of RBC.

As Hb is the major RBC component and as it possesses pro-oxidant properties (Francis, Sullivan et Goldberg, 1997; Huffman *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2004), its implication in DSRBC- and oxidized RBC-induced apoptosis was evaluated. During *Plasmodium* infection, MP ingest Hb predominantly during RBC phagocytosis but also via the uptake of cell-free Hb released in the blood (Arese, Turrini et Ginsburg, 1991; Sobolewski *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2009). Data with the *Pcc* infection model reveal total and protein-free HE plasma concentrations as high as 100  $\mu$ M (65  $\mu$ g/mL) and 6  $\mu$ M (4  $\mu$ g/mL) in mice at peak infection (Seixas *et al.*, 2009). As protein associated HE is found mostly in the form of Hb and as each molecule of Hb contains four HE nuclei, plasma concentrations of cell-free Hb on the order of 25  $\mu$ M (1.5 mg/mL) are then assumed. In addition, data with the *PbA* infection model reveal Hb concentration in plasma on the order of 100  $\mu$ M (6 mg/mL) (Sobolewski *et al.*, 2005), and comparatively, plasmatic concentrations of Hb at approximately 13  $\mu$ M (0.8 mg/mL) have been associated to sickle cell anaemia (Lezcano *et al.*, 2006). Based on this information, physiologically relevant concentrations of Hb not exceeding 4 mg/mL were used in our study.

Hb significantly induced J774A.1 MP apoptosis at concentrations  $\geq 3$  mg/mL (Fig. 4.5.A). To further characterize the implication of Hb in the induction of MP apoptosis by oxidized RBC and DSRBC, RBC ghosts were prepared following a standard procedure (Wunderlich *et al.*, 1987; Millington *et al.*, 2006). DSRBC ghosts contain plasma membranes, parasites, and the malarial pigment HZ but are deprived of all soluble factors,

including Hb, following hypotonic lysis (Wunderlich *et al.*, 1987; Millington *et al.*, 2006). A morphological analysis of MP revealed that ghosts were phagocytised (data not shown), and ratios as high as 1:800 were tested to compensate for a potentially reduced RBC ghost ingestion compared with intact RBC. Although DSRBC decreased MP viability, DSRBC ghosts failed to induce significant apoptosis, even at ratios as high as 1:800 (Fig. 4.5.B). These results suggest that MP apoptosis, induced by DSRBC, is not triggered by RBC membranes, parasites, or HZ but rather, by soluble intracellular DSRBC components. Similar results were obtained with oxidized RBC ghosts, confirming that the induction of apoptosis relies on soluble intracellular RBC components (Fig. 4.5.C). This experiment also ruled out the possibility that the apoptosis induced by oxidized RBC could be mediated by toxic peroxidized membrane lipids generated following the oxidative treatment rather than by erythrophagocytosis itself (Alcouffe *et al.*, 2004). In addition, treatment of MP with cytosolic preparations from DSRBC induced significant MP death, confirming that soluble intracellular components are responsible for oxidized RBC and DSRBC pro-apoptotic abilities (data not shown). As Hb is able to induce apoptosis and is the major RBC intracellular soluble factor, it is likely that Hb is responsible for most if not all of the apoptosis of MP induced by DSRBC and oxidized RBC. However, as ghost preparations remove all RBC soluble factors, it is impossible to rule out the possibility that additional RBC soluble factors may partially contribute to cell death.

#### **4.4.5. ROS are involved in Hb-dependent J774A.1 MP apoptosis induced by DSRBC and oxidized RBC**

Hb is composed of four subunits, each containing one heme nucleus. Following phagocytosis of RBC, the protein fraction of Hb is digested, and HE, the oxidized form of heme (Goldstein *et al.*, 2003; Knutson *et al.*, 2003; Greer *et al.*, 2008), is degraded further in the cytoplasm by the microsomal enzyme HO-1 (Otterbein et Choi, 2000). HE induces ROS and may cause lipid peroxidation, DNA damage and/or protein aggregation, leading to cell death (Kumar et Bandyopadhyay, 2005). Therefore, we hypothesized that the Hb-mediated pro-apoptotic properties of oxidized RBC and DSRBC were a result of HE, and consequently, its effects on apoptosis and ROS production were investigated.

HE concentrations from 25 to 400  $\mu\text{g/mL}$ , equivalent to Hb concentrations of 0.5–9 mg/mL in terms of HE content, were used *in vitro*. HE significantly induced J774A.1 MP apoptosis at concentrations higher than 50  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 4.6.A), suggesting its implication in MP apoptosis following treatments with oxidized RBC or DSRBC. HE accumulation within J774A.1 MP following CRBC and oxidized RBC treatments was evaluated, and in accordance with our phagocytosis assay (Fig. 4.1), HE content was 10 times higher in MP treated with oxidized RBC when compared with CRBC-treated MP (Fig. 4.6.B). As HE quantification assays do not allow distinguishing biologically active, free HE from HZ (inactive biocrystallized HE) (Schwarzer, Turrini et Arese, 1994; Scorza *et al.*, 1999), which is unable to promote oxidation (Schwarzer *et al.*, 1992; Schwarzer *et al.*, 1999) or MP apoptosis (data not shown), HE content, following DSRBC treatment, was not evaluated.

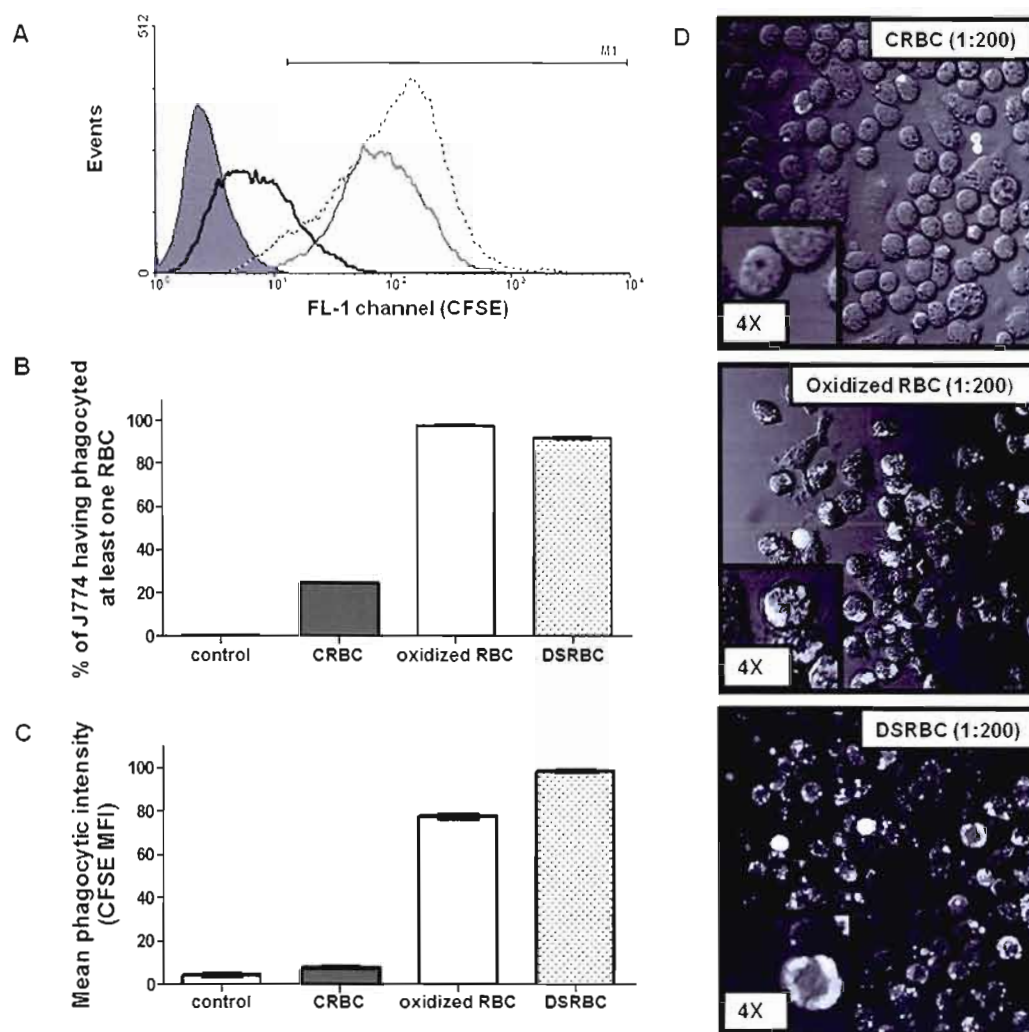
To determine whether apoptosis associated to ROS production, J774A.1 MP were treated with the  $\text{H}_2\text{-DCFDA}$  probe to monitor oxidative stress after 48 h of incubation with oxidized RBC, DSRBC or HE (Fig. 4.7.A). All three treatments induced a dose-dependent increase in ROS responses by J774A.1 MP (Fig. 4.7.A). To determine if redox imbalance is involved in J774A.1 MP apoptosis, the antioxidant GSH was used to treat the cells. Pre-treatment with GSH partially reduced the apoptosis induced by HE (Fig. 4.7.B), suggesting the implication of oxidative stress in the changes in cell viability induced by enhanced erythrophagocytosis.

#### **4.4.6. Oxidized RBC-, DSRBC-, and HE-treated J774A.1 MP enter apoptosis despite induction of HO-1**

Induction of HO-1 represents an important mechanism for HE detoxification (Kumar et Bandyopadhyay, 2005) and is responsible for the enzymatic degradation of HE into CO, free iron, and biliverdin (Otterbein et Choi, 2000). HO-1 is strongly induced by various stresses and by its specific substrate HE (Kumar et Bandyopadhyay, 2005). We investigated whether MP apoptosis resulted from inadequate induction of HO-1 by monitoring its protein expression in J774A.1 MP incubated with oxidized RBC, DSRBC or HE (Fig. 4.8.A). Oxidized RBC, DSRBC, and HE were tested at non-apoptotic (25  $\mu\text{g/mL}$  and 1:50,

respectively) and apoptotic (200  $\mu\text{g/mL}$  and 1:100/1:200, respectively) concentrations. Induction of HO-1 was comparable after 6, 24, and 48 h in HE-treated J774A.1 MP for non-apoptotic and apoptotic concentrations, suggesting that inadequate expression of HO-1 is not responsible for apoptosis. In a similar manner, oxidized RBC and DSRBC induced comparable HO-1 protein expression levels for every ratio tested.

The increased expression of HO-1 induced by HE may also generate potentially dangerous free iron (Otterbein et Choi, 2000). When neutralized by ferritin or directed to microsomal vesicles for exocytosis by iron ATPases, free iron does not represent a threat for cell viability (Baranano *et al.*, 2000; Otterbein et Choi, 2000). However, if these two protective mechanisms are saturated, free  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  can produce ROS via the Haber-Weiss and Fenton reaction and threaten cell viability (Gutteridge, 1986). To determine whether the induction of HO-1 expression could account for excessive production of free iron and apoptosis, its activity was inhibited by treatment with the competitive inhibitor ZnPPIX. Preliminary experiments revealed that ZnPPIX, at concentrations known to inhibit HO-1 activity effectively, is highly toxic in our 48 h experimental settings and significantly impairs the phagocytic activity of J774A.1 MP after 24 h treatment (data not shown). Therefore, the inhibitor was used at a relatively low concentration (2.5  $\mu\text{M}$ ), which was shown not to affect cell viability and phagocytosis in 24 h experiments. These restrictions did not allow us to test the effect of ZnPPIX in oxidized RBC- or DSRBC-treated cells, as the induction of apoptosis requires a 48 h incubation (data not shown). However, the impact of HO-1 inhibition was assessed in HE-treated cells, which enter apoptosis after 24 h incubation. Under these conditions, inhibition of HO-1 did not have a major impact on cell viability, except for the highest concentration of HE tested (400  $\mu\text{g/mL}$ ), for which, it promoted a sharp increase of MP apoptosis (Fig. 4.8.B). These results suggest that induction of HO-1 reported in J774A.1 MP treated with oxidized RBC, DSRBC, or HE (Fig. 4.8.A and B) represents a protective yet not sufficient mechanism in abrogating the oxidant, pro-apoptotic effects of HE.



**Figure 4.1: Oxidized RBC and DSRBC are readily phagocytised by J774A.1 MP**

J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with CFSE-labelled CRBC, oxidized RBC, or DSRBC at a MP:RBC ratio 1:200, and phagocytosis was evaluated after 24 h. (A) Characteristic histograms obtained by FACS for the fluorescence 1 (FL-1) channel (CFSE). Filled histogram stands for control J774 A.1 MP; black, gray, and dotted line histograms represent CRBC-, oxidized RBC-, and DSRBC-treated J774A.1 MP, respectively. M1 gate considers CFSE<sup>+</sup> MP, which have ingested at least one RBC. (B) Percentages of J774A.1 MP that have ingested one or more RBC (M1 gate). (C) J774A.1 MP mean phagocytic activity (measured as CFSE MFI). (D) Characteristic results obtained by confocal microscopy. Top, middle, and bottom panels show CRBC-, oxidized RBC-, and DSRBC-treated J774A.1 MP, respectively. Each panel represents an overlay of the transmission light channel and the CFSE fluorescence channel (in white on images). Data are representative of two independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from triplicate cultures of one experiment.



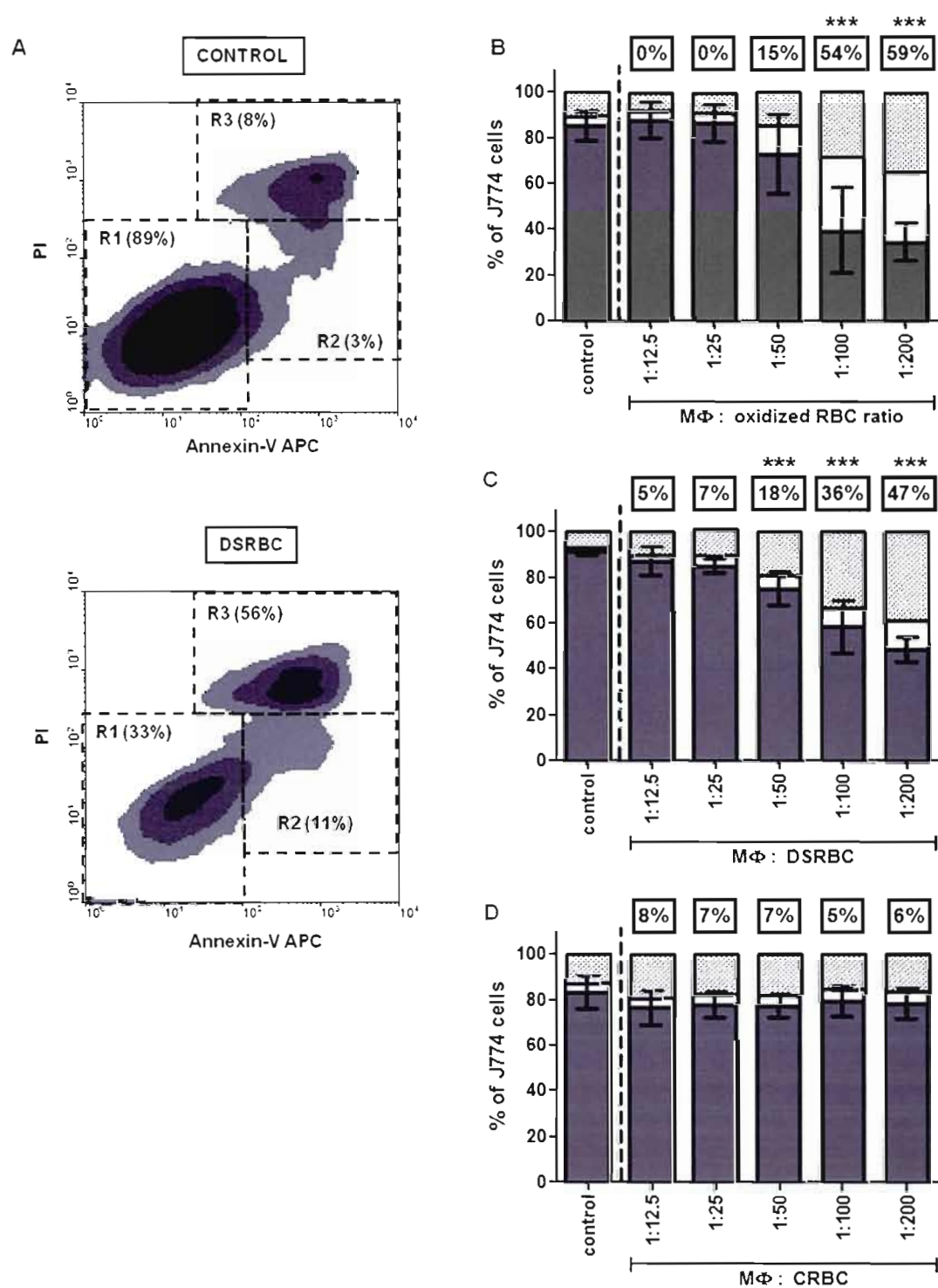


Figure 4.2: Apoptosis of J774A.1 MP is induced by oxidized RBC and DSRBC *in vitro*



**Figure 4.2: Apoptosis of J774A.1 MP is induced by oxidized RBC and DSRBC *in vitro***

(A–D) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with CRBC, DSRBC, or oxidized RBC at the indicated MP:RBC ratios. After 48 h, apoptosis was quantified by Annexin-V/PI staining. (A) Characteristic density plots obtained for control (upper panel) and DSRBC-treated (MP:RBC ratio 1:200, lower panel) J774A.1 MP. R1, R2, and R3 gates, respectively, account for the percentages of viable, early-apoptotic, and late apoptotic/necrotic cells in the MP population. (B) Impact of various MP (M $\phi$ ):oxidized RBC ratios on J774A.1 MP viability. (C) Impact of various MP:DSBC ratios on J774A.1 MP viability. (D) Impact of various MP:CRBC ratios on J774A.1 MP viability. Gray, white, and dotted histogram regions, respectively, represent the percentage of viable, early-apoptotic, and late-apoptotic/necrotic cells. The percentage above each histogram represents the percentage of viability reduction compared with control cells. Data are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments with triplicate cultures. Asterisks represent significant differences in the percentage of viable cells compared with untreated J774A.1 MP (control). Statistical analysis, ANOVA (\*\* $P < 0.001$ ).

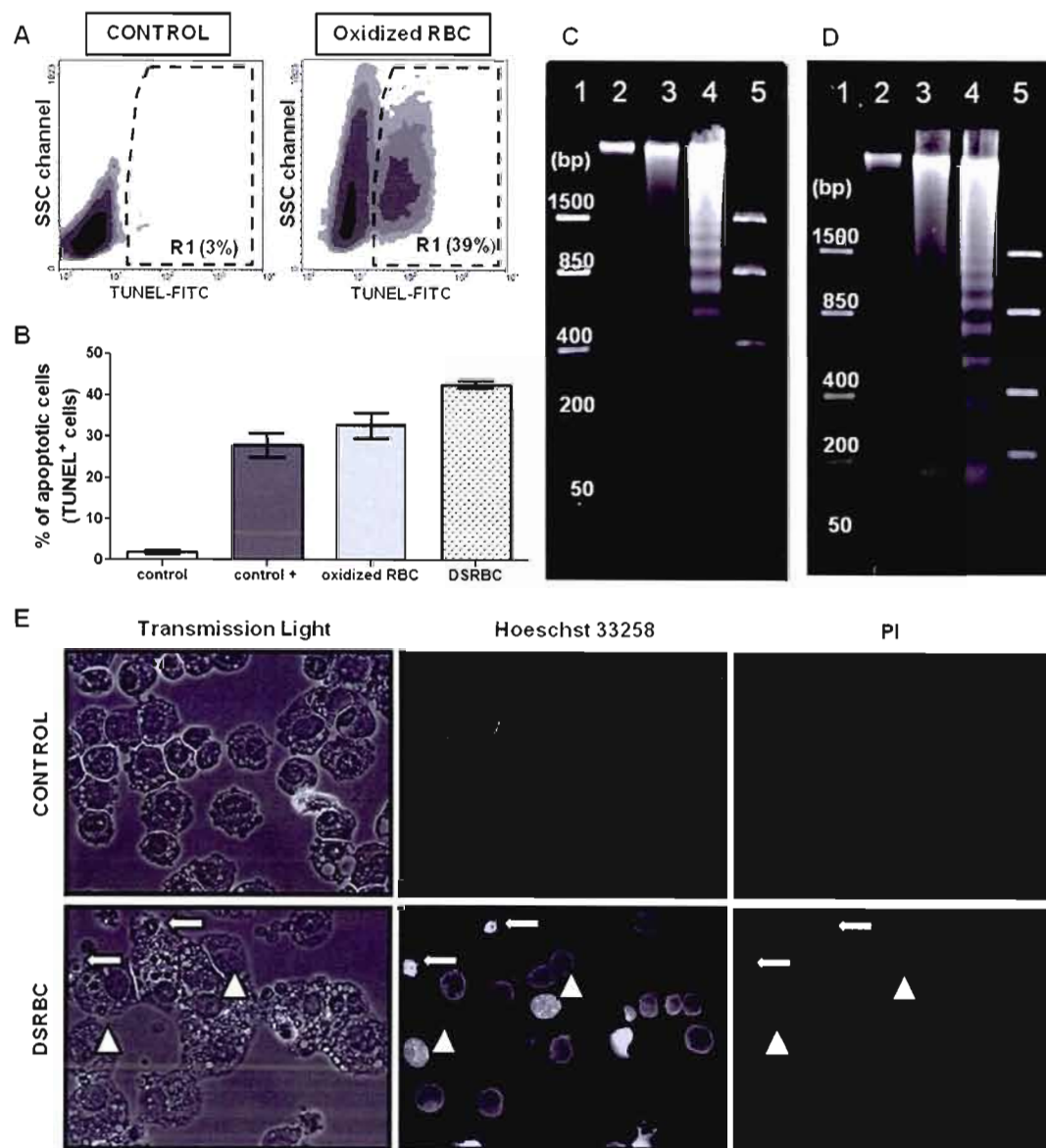
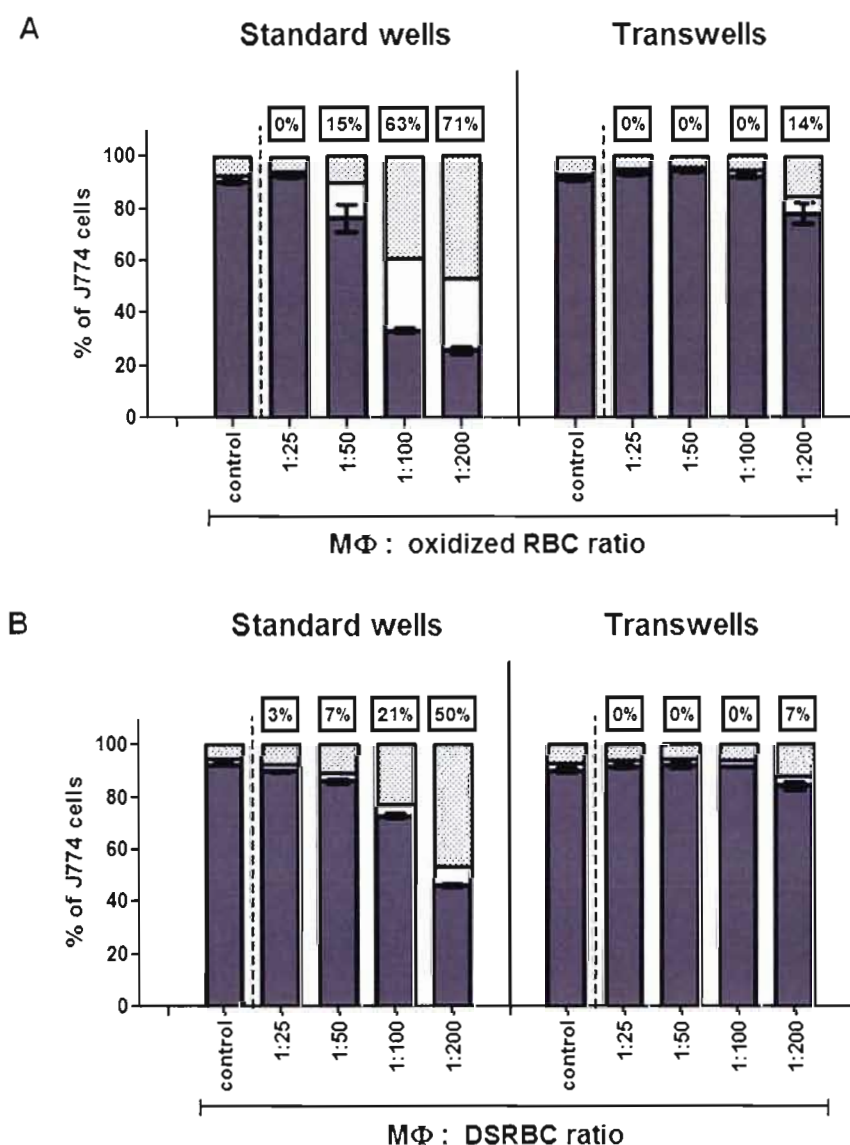


Figure 4.3: Oxidized RBC and DSRBC induce apoptosis in J774A.1 MP cells

**Figure 4.3: Oxidized RBC and DSRBC induce apoptosis in J774A.1 MP cells**

J774A.1 MP remained untreated (control) or were incubated with oxidized RBC or DSRBC at the MP:RBC ratio 1:100. Camptothecin was used as a positive control for apoptosis. After 48 h, cell viability was assayed by TUNEL staining (A and B), DNA migration on agarose gel (C and D), or Hoechst/PI staining (E). (A) Characteristic density plots obtained for control (left panel) and oxidized RBC (MP:RBC ratio 1:100, right panel)-treated J774A.1 MP. R1 gate represents the percentage of TUNEL<sup>+</sup> cells (i.e., apoptotic cells). SSC, Side-scatter. (B) Impact of Camptothecin, oxidized RBC, and DSRBC on the percentages of TUNEL<sup>+</sup> J774A.1 MP. (C) DNA profiles of control (Lane 2), oxidized RBC (Lane 3), or camptothecin (Lane 4)-treated J774A.1 MP; Lanes 1 and 5, DNA ladder. (D) DNA profiles of control (Lane 2), DSRBC (Lane 3), or camptothecin (Lane 4)-treated J774A.1 MP. Lanes 1 and 5: DNA ladder. (E) Hoechst/PI-stained J774A.1 MP analyzed by fluorescence microscopy on cytospin slides. Columns 1–3 represent transmission light images, Hoechst fluorescence, and PI fluorescence, respectively. Triangles indicate typical early-apoptosis cells and arrows identify characteristic late-apoptotic cells. Data are representative of two independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from quadruplicate cultures of one experiment.



**Figure 4.4: Cell-to-cell contact is required for induction of J774A.1 apoptosis by oxidized RBC and DSRBC**

J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with oxidized RBC (A) or DSRBC (B) at the indicated MP:RBC ratios. Cells were incubated in standard wells or in transwells. After 48 h, cell viability was assayed by Annexin-V/PI staining (A and B). Gray, white, and dotted histogram regions, respectively, represent the percentage of viable, early-apoptotic and late-apoptotic/necrotic cells. The percentage above each histogram represents the percentage of viability reduction compared with control cells. Data are representative of two independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from quadruplicate cultures of one experiment.

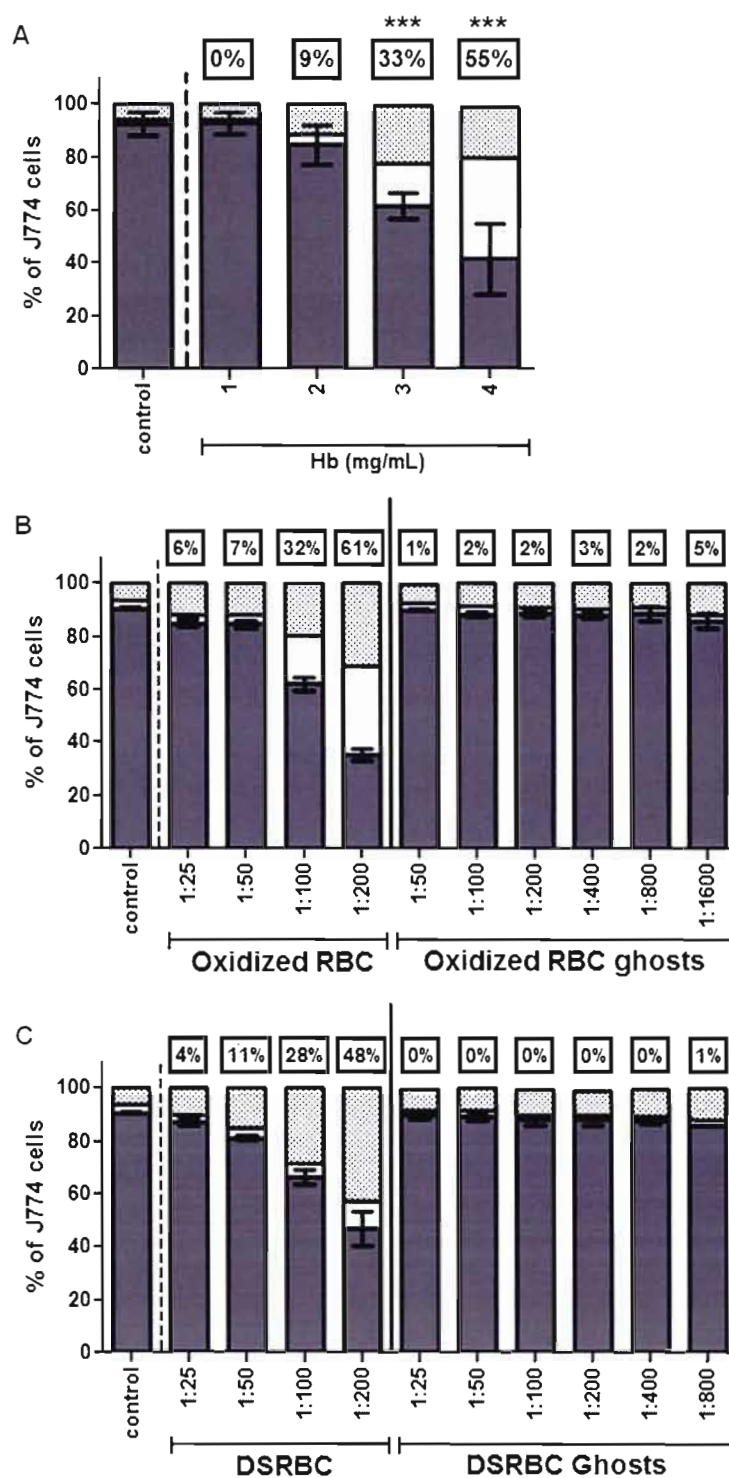
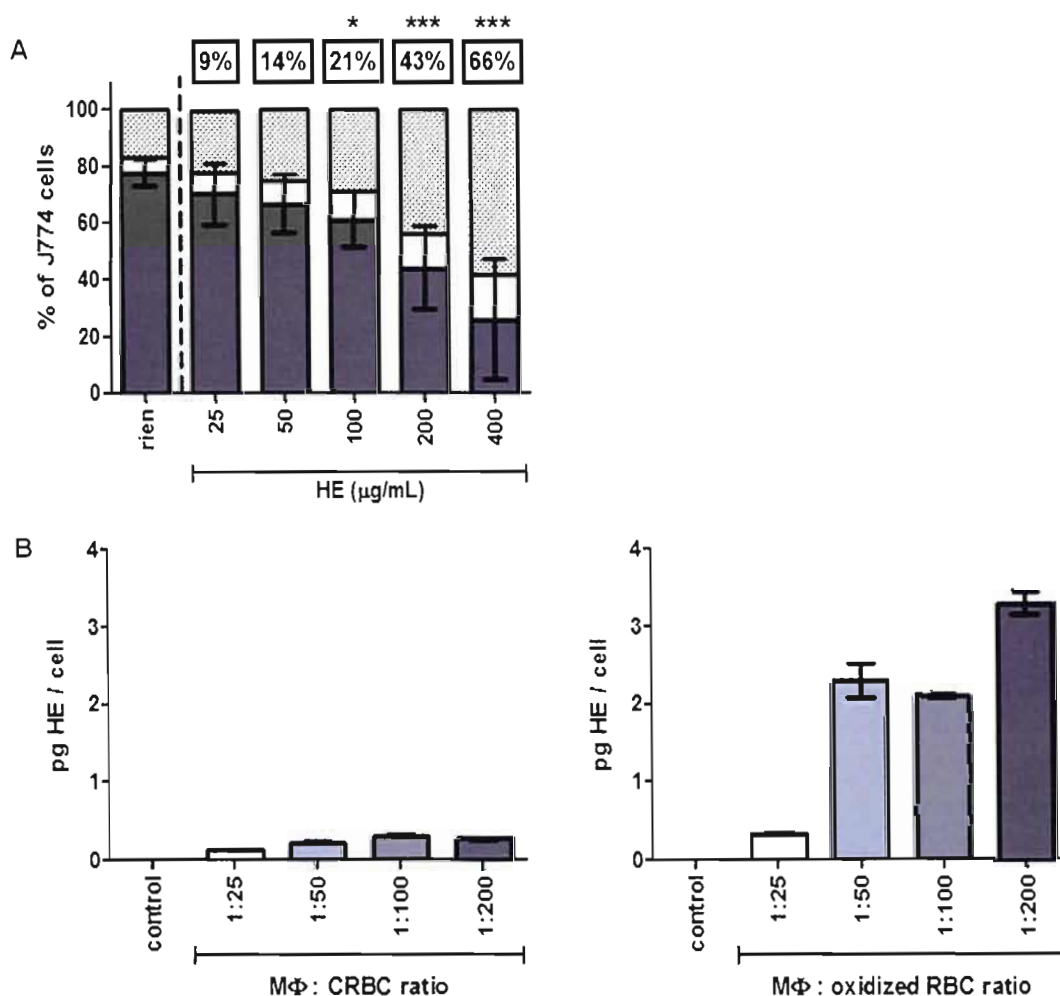


Figure 4.5: Ingestion of Hb by phagocytes is responsible for J774A.1 MP apoptosis

**Figure 4.5: Ingestion of Hb by phagocytes is responsible for J774A.1 MP apoptosis**

(A) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with the indicated Hb concentrations. (B and C) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with oxidized RBC and oxidized RBC ghosts (B) or with DSRBC and DSRBC ghosts (C) at the indicated MP:RBC ratios. After 48 h, cell viability was assayed by Annexin-V/PI staining (A–C). Gray, white, and dotted histogram regions, respectively, represent the percentage of viable, early-apoptotic and late-apoptotic/necrotic cells. The percentage above each histogram represents the percentage of viability reduction compared with control cells. (A) Data are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments with duplicate or triplicate cultures. The asterisks represent significant differences in the percentage of viable cells compared with untreated J774A.1 MP (control). Statistical analysis, ANOVA (\*\* $P$ <0.001). (B and C) Data are representative of two independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from triplicate cultures of one experiment.



**Figure 4.6: HE possesses pro-apoptotic abilities and accumulates within J774A.1 MP following oxidized RBC treatment**

(A) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with the indicated HE concentrations. After 48 h, cell viability was assayed by Annexin-V/PI staining. Gray, white, and dotted histogram regions, respectively, represent the percentage of viable, early-apoptotic, and late-apoptotic/necrotic cells. The percentage above each histogram represents the percentage of viability reduction compared with control cells. (B) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with CRBC (left graph) or with oxidized RBC (right graph) at the indicated MP:RBC ratios. After 48 h, HE content was measured based on HE-elicited luminescence. (A) Data are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments with duplicate or triplicate cultures. The asterisks represent significant differences in the percentage of viable cells compared with untreated J774A.1 MP (control). Statistical analysis, ANOVA (\* $P$ <0.05; \*\*\* $P$ <0.001). (B) Data are representative of two independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from quadruplicate cultures of one experiment.



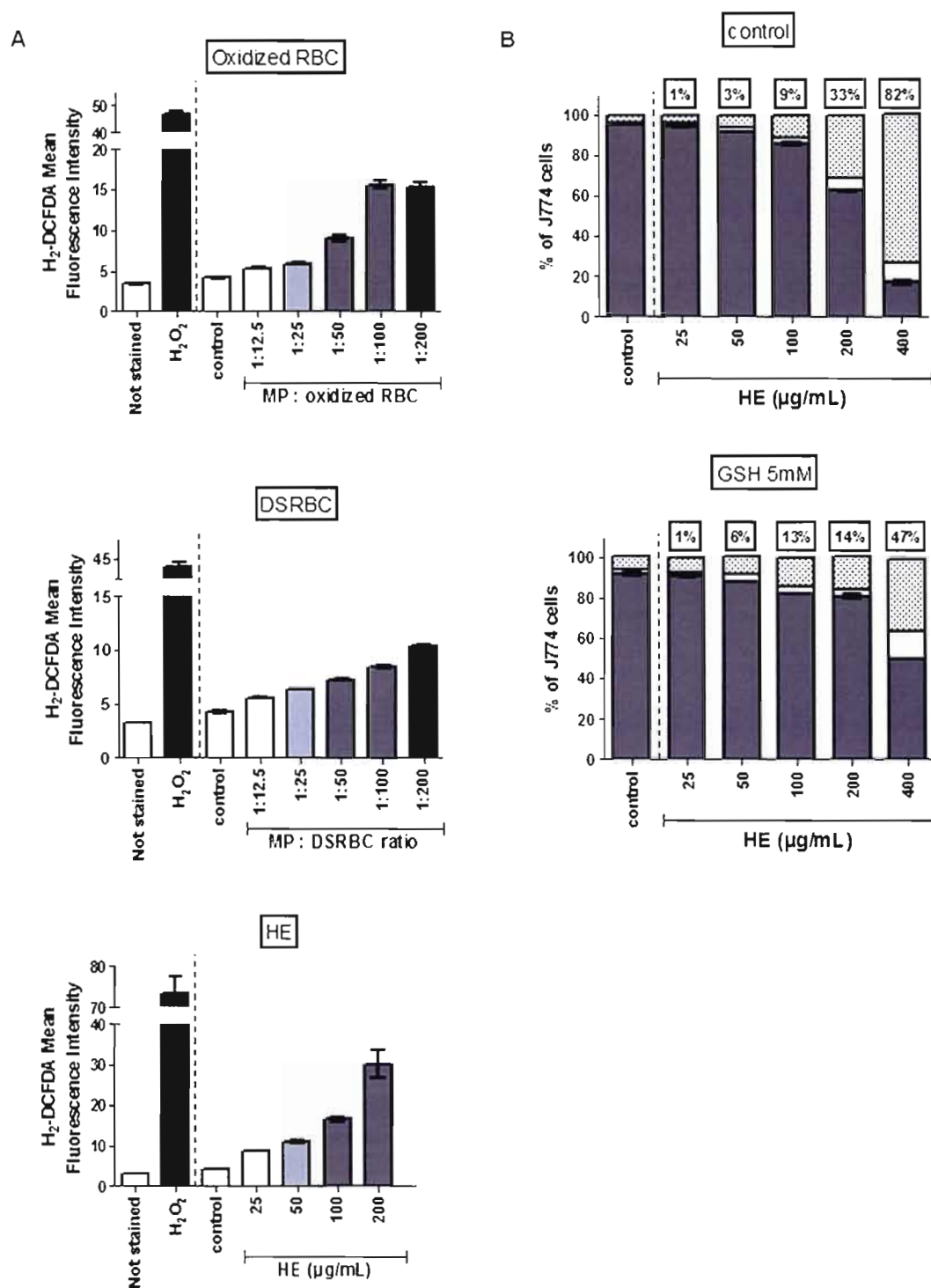


Figure 4.7: Oxidized RBC and DSRBC induce J774A.1 MP apoptosis through a HE-mediated redox imbalance



**Figure 4.7: Oxidized RBC and DSRBC induce J774A.1 MP apoptosis through a HE-mediated redox imbalance**

(A) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with oxidized RBC (top graph) or DSRBC (middle graph) at the indicated MP:RBC ratios or with HE (bottom graph) at the indicated concentrations.  $H_2O_2$  was used as a positive control. After 48 h, ROS production was followed by treatment with  $H_2$ -DCFDA. (B) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with the indicated HE concentrations in the absence (upper graph) or presence of GSH 5 mM (lower graph). After 24 h, cell viability was assayed by Annexin-V/PI staining. Gray, white, and dotted histogram regions, respectively, represent the percentage of viable, early-apoptotic, and late-apoptotic/necrotic cells. The percentage above each histogram represents the percentage of viability reduction compared with control cells. (A) Data are representative of two and (B) three independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from triplicate cultures of one experiment.

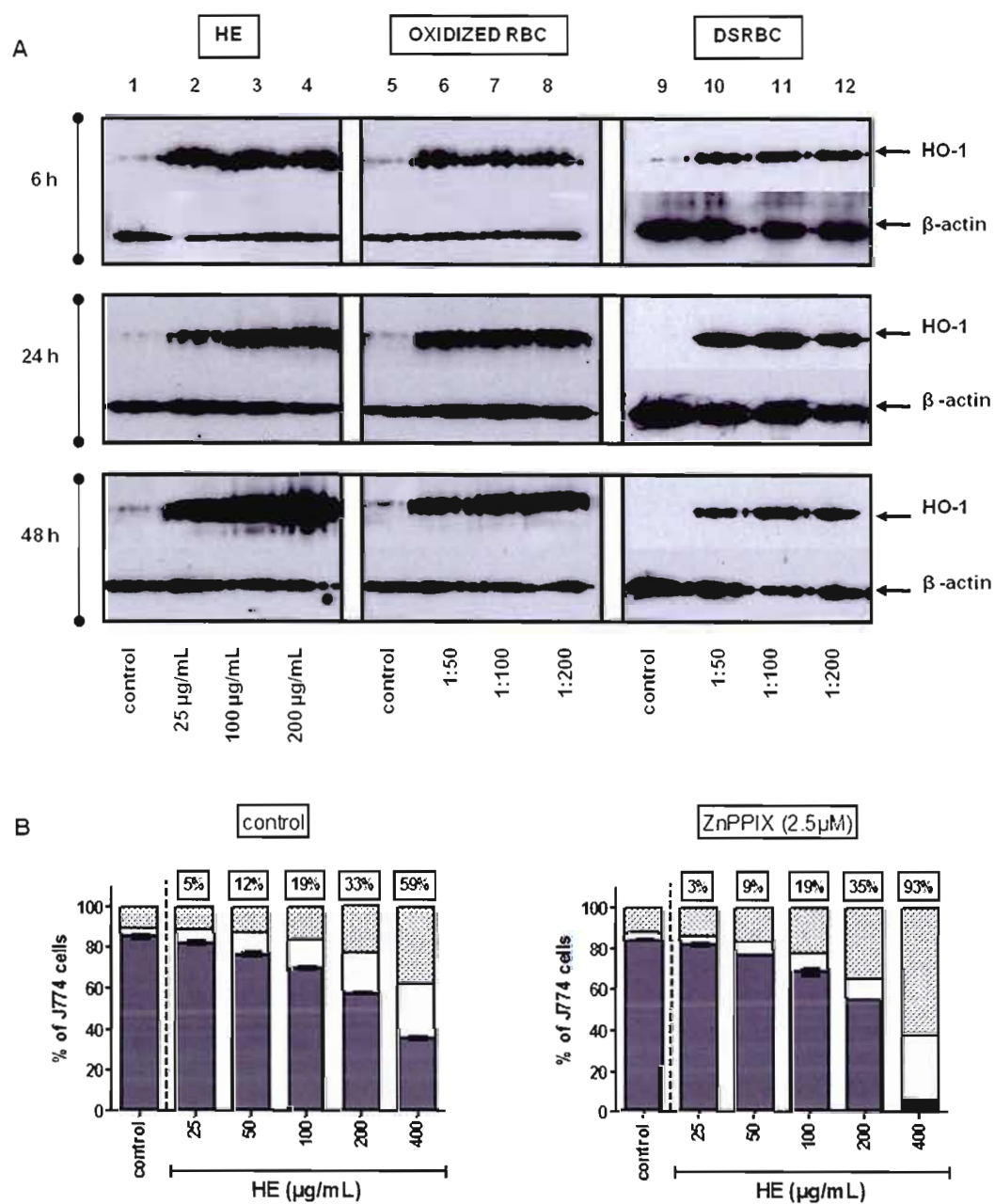


Figure 4.8: HO-1 activation as a protective mechanism following oxidized RBC, DSRBC, and HE *in vitro* treatment of J774 MP

**Figure 4.8: HO-1 activation as a protective mechanism following oxidized RBC, DSRBC, and HE *in vitro* treatment of J774 MP**

(A) J774A.1 MP were left untreated (control) or incubated with oxidized RBC, DSRBC, or HE. Lanes 1, 5, and 9, Control J774A.1 MP; Lane 2–4, J774A.1 MP treated with HE at 25, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectively; Lanes 6–8, J774A.1 MP treated with oxidized RBC at 1:50, 1:100, and 1:200, respectively; Lanes 10–12, J774A.1 MP treated with DSRBC at 1:50, 1:100, and 1:200, respectively. After 6, 24, and 48 h, HO-1 expression was monitored by Western blot.  $\beta$ -actin was used as an internal control. This experiment has been repeated twice with similar trends. (B) J774A.1 MP were left untreated (control) or were incubated with the indicated HE concentrations in the absence (left graph) or presence of ZnPPiX 2.5  $\mu\text{M}$  (right graph). After 24 h, cell viability was assayed by Annexin-V/P staining. Gray, white, and dotted histogram regions, respectively, represent the percentage of viable, early-apoptotic, and late-apoptotic/necrotic cells. The percentage above each histogram represents the percentage of viability reduction compared with control cells. Data are representative of two independent experiments showing the mean  $\pm$  SD from triplicate cultures of one experiment.

## 4.5. DISCUSSION

Clearance of senescent RBC by splenic RES MP is a continuous event (Mebius et Kraal, 2005; Saxena et Khandelwal, 2009). Although erythrophagocytosis is relatively modest under steady-state conditions (Saxena et Khandelwal, 2009), it is enhanced drastically during haemolytic disorders such as malaria, thalassemia, and sickle anaemia (Hebbel, 1991; Turrini *et al.*, 1992; Chang et Stevenson, 2004). Considering that MP are important for innate and adaptive immune responses against pathogens (Goldsby *et al.*, 2003), the impact of sustained erythrophagocytosis on their viability was investigated. In the present study, using two different models, we demonstrate that robust erythrophagocytosis leads to significant apoptosis of J774A.1 MP *in vitro*. These results were corroborated using four different techniques to measure apoptosis. Certain discrepancies concerning the level of apoptosis in camptothecin-treated MP were, however, observed between the TUNEL assay and the analysis of DNA fragmentation on agarose gels (Fig. 4.3), which we suggest are inherent to technical limitations with the TUNEL assay. Indeed, higher percentages of late apoptotic cells and apoptotic bodies are visualized by confocal microscopy in camptothecin-treated cultures, rendering these samples more susceptible to cell lysis during manipulation. As the TUNEL assay involves numerous experimental steps that may eliminate a proportion of the fragile late-apoptotic cells and as this assay is restricted to intact cells—apoptotic bodies are indiscernible from debris and excluded from FACS analysis—apoptosis levels in camptothecin-treated cultures may be underestimated using the TUNEL assay. Thus, DNA migration on agarose gel may better correlate with the microscopic observations, showing more pronounced apoptosis in camptothecin-treated MP.

The DSRBC model, representing RBC with physiological alterations, allowed excluding the participation of RBC modifications and/or erythrophagocytosis levels that are unlikely to occur *in vivo*. Following erythrophagocytosis, important amounts of HE accumulate within phagocytes. HE induces pro-apoptotic effects through a mechanism partially involving oxidative stress. Apoptosis in response to robust erythrophagocytosis was not restricted to J774A.1 MP, as comparable levels of apoptosis were measured in BMDM from BALB/c mice following RBC phagocytosis (data not shown).

Erythrophagocytosis was shown to trigger MP death only under conditions of robust phagocytosis. In this respect, CRBC were weakly internalized and had a modest effect on MP viability. In contrast, oxidized RBC or DSRBC were intensely ingested and promoted significant apoptosis. Although phagocytosis of DSRBC and oxidized RBC was measurable after 4 h of incubation, induction of apoptosis required 48 h incubation (data not shown). The delayed toxic effect suggests that important ingestion of Hb/HE and/or release of its breakdown products may be required. Interestingly, previous studies reported that MP, allowed to phagocytose IgG-opsonized RBC for 2 h, remained viable over a 48- to 72-h period, confirming that the induction of MP apoptosis requires a sustained and robust erythrophagocytosis (Commins, Loegering et Gudewicz, 1990; Loegering *et al.*, 1996). Taken together, these results indicate that although MP may safely handle the clearance of modest amounts of RBC (reflecting steady-state conditions), intense erythrophagocytosis (reflecting haemolytic disorders) gradually induces the apoptosis of MP. In addition, our results demonstrate that in the context of robust erythrophagocytosis, ingestion of large amounts of Hb/HE promotes oxidative insults, which may exceed the protective mechanisms of MP, resulting in cell death (Postma *et al.*, 1996; Francis, Sullivan et Goldberg, 1997; Becker *et al.*, 2004). In this respect, the expression of HO-1, the main HE detoxification system (Kumar et Bandyopadhyay, 2005), was shown to be induced strongly and comparably following treatments with suboptimal and optimal concentrations of pro-apoptotic RBC or RBC-derived compounds. Therefore, although optimally activated, this protective enzyme seems insufficient for detoxifying the large amount of internalized Hb/HE in MP.

As described previously, modifications of infected RBC and uninfected RBC membranes are reported in malaria, leading to their recognition and elimination by RES MP (Turrini *et al.*, 1992; Omodeo-Sale *et al.*, 2003; Chang et Stevenson, 2004). Our *in vitro* results suggest that robust ingestion of DSRBC triggers MP apoptosis, which may account for the significant MP death measured in malaria (Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). However, additional experiments are required to determine whether the intensity of erythrophagocytosis *in vivo* is sufficient to promote RES MP apoptosis. In addition, the implication of other bystander effects of *Plasmodium* infection on MP apoptosis cannot be excluded. As RES MP are involved in the elimination of blood borne pathogens (Wooles et

Diluzio, 1963; Singer, 1973; Goldsby *et al.*, 2003), elevated levels of apoptotic MP may be responsible for the enhanced susceptibility to bacterial infections reported in *Plasmodium*-infected patients (Mabey, Brown et Greenwood, 1987). MP viability can be compromised in other haemolytic disorders, such as sickle cell anaemia and thalassemia, where important RBC clearance by splenic RES MP is reported (Hebbel, 1991; Browne *et al.*, 1997; Browne, Shalev et Hebbel, 1998). The fact that these diseases are also linked with increased susceptibility to bacterial infections (Kaye et Hook, 1963; Loegering *et al.*, 1987) tends to support this hypothesis.

Hb and HE are toxic for a variety of cells through oxidative and non-oxidative mechanisms (Goldstein *et al.*, 2003). Previous *in vitro* studies demonstrate that short-term phagocytosis of RBC (2 h) inhibits various MP functions through a Hb-dependent mechanism, without affecting cell viability (Commins, Loegering et Gudewicz, 1990; Loegering *et al.*, 1996). Our study is the first one to report that long-term (48 h) erythrophagocytosis hampers MP viability. In addition, our data indicate that erythrophagocytosis-dependent MP apoptosis is mediated by Hb. MP dysfunctions (Loegering *et al.*, 1996) and MP apoptosis (the present study) triggered by erythrophagocytosis are linked to oxidative stress. ROS production is a common feature of Hb catabolism within MP. In the phagosome, Hb is oxidized to metHb, leading to equimolar production of superoxide ions and the release of HE (Goldstein *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Greer *et al.*, 2008). Iron is then produced by enzymatic (via HO-1 (Otterbein et Choi, 2000)) or non-enzymatic (via peroxides (Kremer, 1989)) degradation of HE. Although HE is able to trigger lipid peroxidation (O'Brien et Little, 1969), oxidative insults also derive from ROS, produced via the Fenton reaction, catalyzed by free iron (Gutteridge, 1986). As a result of the toxicity of iron chelators over a 24 to 48 h incubation period with MP (data not shown and refs. (Buss, Neuzil et Ponka, 2004; Kurz, Gustafsson et Brunk, 2006; Simunek *et al.*, 2008)), assessment of the effect of iron chelation on the apoptosis induced by oxidized RBC, DSRBC, or HE was not feasible. As ROS are able to promote mitochondrial membrane destabilization (Simon, Haj-Yehia et Levi-Schaffer, 2000), it is tempting to speculate that Hb/HE-induced oxidative stress triggers apoptosis through the intrinsic pathway (Elmore, 2007). Indeed, resulting mitochondrial membrane destabilization may promote the release of

pro-apoptotic molecules, such as the cytochrome c; second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis protein-binding protein with low pI (Smac/Diablo); HtrA2/Omi; apoptosis-inducing factors (AIF); and the endonuclease G, leading to downstream activation of caspase-9 and caspase-3 (Elmore, 2007). Activated caspase 3 may then promote inhibitor of the caspase-activated DNase (ICAD) degradation and the release of the endonuclease CAD (CAD) responsible for the DNA fragmentation characteristic of apoptotic cell death (Sakahira, Enari et Nagata, 1998).

*Plasmodium* infection and other haemolytic disorders associate with increased plasma concentrations of cell-free Hb/HE (Naumann *et al.*, 1971; Sobolewski *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2009). In respect to our experimental results, the cell-free Hb and HE plasma concentrations reported *in vivo* during *Plasmodium* infection (Sobolewski *et al.*, 2005; Lezcano *et al.*, 2006; Seixas *et al.*, 2009) could be sufficiently high to promote significant MP apoptosis. Moreover, Seixas *et al.* reported that the toxicity of HE is greatly enhanced by TNF- $\alpha$  (Seixas *et al.*, 2009), a common cytokine in malaria (Kwiatkowski *et al.*, 1990; McGuire *et al.*, 1998; Seixas *et al.*, 2009), thalassemia (Wanachiwanawin *et al.*, 1999), and sickle cell anaemia (Kuvibidila *et al.*, 1997). Therefore, it is tempting to suggest that the threshold concentrations of cell-free Hb/HE, required to induce MP apoptosis during those disorders, may be lower than those reported in our study. In addition, the Hb and HE scavengers Hx and Hp, found in serum, enhance the uptake of these molecules by MP (Ferreira *et al.*, 2008). As the proportion of serum in blood is greater than in CM (containing only 10% of FBS), *in vivo* uptake of HE and Hb by MP may be intensified further. Taken together, these results suggest that erythrophagocytosis and ingestion of cell-free Hb/HE may contribute to the induction of MP apoptosis during haemolytic disorders.

The impact of phagocytosis on cell viability has been investigated extensively (DeLeo, 2004; Hacker, Kirschnek et Fischer, 2006). Although MP apoptosis is infrequent after bacteria ingestion, uptake of complement- or antibody-opsonized zymosan particles was shown to enhance ROS production and to promote MP death (Kim *et al.*, 2003; Park, 2003). In our study, DSRBC and oxidized RBC ghosts were phagocytised efficiently (data not shown) but failed to induce MP apoptosis. This suggests that the phagocytic process itself is not responsible for the decreased viability of MP. However, clearance of DSRBC and

oxidized RBC (Turrini *et al.*, 1992; Bratosin *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 2004; Chang et Stevenson, 2004) implicates their recognition via FcR, a process known to generate ROS through the activation of NADPH oxidase (Loefering *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2003). Therefore, it is possible that the phagocytic process generates ROS, which contributes further to the oxidative stress and MP apoptosis. In this respect, Loefering *et al.* (Loefering *et al.*, 1996) showed that ROS, originating from Hb ingestion and from NADPH oxidase activation, were required for the dysfunction of MP associated to erythrophagocytosis.

In our study, 30–40% of the J774A.1 MP population was resistant to apoptosis, even if the proportion of RBC or the incubation time was increased (data not shown). As depicted in Fig. 4.1.D, the phagocytic activity of the J774A.1 MP population is heterogeneous. Approximately 50% of the MP ingested RBC in a large amount, whereas the remaining 50% did not contain or contained only few RBC. This discrepancy in phagocytic activity could explain the fact that the treatment with oxidized RBC and DSRBC did not affect all MP. The mechanism underlying this uneven RBC ingestion is not clear but is common in previous erythrophagocytosis studies that have used peritoneal MP (Ishikawa-Sekigami *et al.*, 2006) or liver sinusoidal cells (Bissell, Hammaker et Schmid, 1972). The authors suggested that this discrepancy could be attributed to the presence of distinct MP populations or to MP harbouring different maturation states. In our experimental settings, the uneven phagocytic activity could also be a result of the fact that the J774A.1 cell line is composed of monocytes and MP.

In conclusion, our data indicate that robust erythrophagocytosis results in the ingestion of Hb/HE, the induction of oxidative stress, and MP apoptosis. These effects may have critical implications for the outcome of *Plasmodium* infection, as MP are involved in the control of parasite burden (Turrini *et al.*, 1992; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; McGilvray *et al.*, 2000) and in the secretion of pro-inflammatory cytokines (Picot *et al.*, 1990; Krishnegowda *et al.*, 2005) responsible for various pathologies (Newton, Hien et White, 2000; Engwerda *et al.*, 2002; Chang et Stevenson, 2004). In addition, these results may be involved in the increased susceptibility to microbial infections associated to malaria and other haemolytic disorders such as thalassemia and sickle cell anaemia.



#### **4.6. AUTHORSHIP**

The present study has been realized by M.C. under the supervision of T.S. (UQAM, Canada). The study conception was made by both authors. M.C. was in charge of the study design and carried out all experimental manipulations as well as all analyses. The manuscript was written by M.C. under the close supervision of T.S.

#### **4.7. ACKNOWLEDGMENTS**

The work in our laboratory is supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. M.C. was a recipient of two FARE scholarships (University du Québec à Montréal) as well as two travel fellowship awards and the Bridging Funds from the Centre for Host-Parasite Interactions (McGill University).

## CHAPITRE V

### DISCUSSION GÉNÉRALE

#### 5.1 Inhibition des cellules T lors de la phase érythrocytaire de la malaria

Tel que décrit précédemment, la malaria est associée à une immunosuppression systémique vraisemblablement impliquée dans la persistance du parasite et dans la susceptibilité accrue aux infections par des pathogènes hétérologues. En particulier, les cellules T provenant de patients atteints de la malaria ou de souris infectées par le *Plasmodium* présentent une prolifération et une sécrétion de cytokines considérablement réduites suite à leur stimulation via leur TCR (Correa, Narayanan et Miller, 1980; Riley *et al.*, 1989; Rockett *et al.*, 1994; Ahvazi, Jacobs et Stevenson, 1995). Du fait de l'importance des cellules T dans la réponse antiparasite (voir par. 1.1.4.2), leur inhibition pourrait avoir des répercussions importantes sur la résolution des infections par *Plasmodium*. Ainsi, mieux comprendre comment les infections par *Plasmodium* modulent l'activité des cellules T est d'une importance capitale.

##### 5.1.1 Implication des cellules T régulatrices dans l'immunosuppression et la pathologie

L'existence de cellules T régulatrices capables de contrôler la réponse immunitaire a été proposée dans les années 70 mais ce n'est que récemment que le facteur FOXP3 a été identifié comme marqueur spécifique des cellules TregN d'origine thymique. Cette découverte a permis d'évaluer l'importance de ces cellules dans diverses pathologies dont la malaria. Dans ce contexte, Hisaeda *et al.* ont suggéré que l'activation des cellules TregN

pendant les infections par *Plasmodium* serait responsable de l'immunosuppression et de la virulence du parasite. Il a notamment été démontré que l'élimination *in vivo* de ces cellules réduisait significativement la suppression affectant les cellules T et permettait aux souris BALB/c de résoudre l'infection par *PyL* normalement létale (Hisaeda *et al.*, 2004). Connaissant le caractère bénéfique de l'activation des cellules TregN dans le contrôle des désordres auto-immuns et des inflammations chroniques (Sakaguchi, 2004; Belkaid et Rouse, 2005), les résultats de Hisaeda *et al.* paraissaient surprenants (Hisaeda *et al.*, 2004). En effet, les infections par *Plasmodium* stimulant une forte réponse inflammatoire impliquée dans l'induction de la malaria cérébrale et dans le développement de l'anémie, l'activation des cellules TregN pourrait représenter un mécanisme protecteur visant à limiter l'inflammation et la pathologie. Ainsi, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'élimination des cellules TregN sur le développement de la pathologie lors des infections par *Pca*. Les espèces *Py* et *Pca* causent des infections présentant les étapes caractéristiques et les stades de maturation classiques du cycle de développement du *Plasmodium*. Néanmoins, la taille de ces parasites ainsi que la durée de chaque étape peuvent différer quelque peu (Tabl. 1.1). L'espèce *Py* infecte de manière préférentielle les réticulocytes alors que l'espèce *Pca* infecte tous les GR. Aucune étude comparant directement les infections par *Py* et *Pca* n'a été publiée pour le moment. La comparaison d'études évaluant individuellement ces deux espèces est délicate et les extrapolations en découlant risquées à cause de la diversité des conditions expérimentales et des techniques utilisées. Bien que *Py* et *Pca* soient capables de causer des infections létales ou non-létales dépendement de la souche de parasite et/ou de souris considérée, les souches de *Py* avec lesquelles nous avons eu l'occasion de travailler (souches YM et 17XNL) engendrent des infections caractérisées par une anémie plus sévère et des parasitémies plus élevées que les souches de *Pca* utilisées dans nos études (résultats non publiés). Il a été suggéré que le développement de la protection contre les infections par l'espèce *Pc* (incluant *Pca* et *Pcc*) nécessite une réponse de type Th1 suivie d'une réponse de type Th2 après le pic d'infection. En revanche, il semblerait que le contrôle efficace des espèces *Py* repose d'avantage sur l'activation rapide d'une forte réponse de type Th2 bien qu'une brève réponse de type Th1 soit observable en début d'infection (Taylor-Robinson *et al.*, 1993; Taylor-Robinson, 2010). D'autres études rapportent cependant qu'une réponse de type Th1 soutenue

est nécessaire au contrôle efficace du parasite quelque soit l'espèce de *Plasmodium* évaluée (Li, Seixas et Langhorne, 2001).

En travaillant avec les souches *Pca* DS et DK, nous avons observé que l'activation des cellules TregN permettait de réduire l'inflammation, de limiter l'anémie et de favoriser la survie des souris. Contrairement aux résultats obtenus par Hisaeda *et al.*, l'élimination des cellules TregN ne diminuait aucunement la suppression affectant les cellules T et ne permettait pas un meilleur contrôle du parasite lors des infections par *Pca* (Cambos *et al.*, 2008). Les cellules TregN sont capables d'inhiber la production d'anticorps des cellules B *in vivo* et ainsi d'affecter une des composantes importantes d'une réponse immunitaire de type Th2 (Lim *et al.*, 2005). Du fait que l'induction d'une forte réponse de type Th2 semble cruciale pour la résolution des infections par *Py* (et non par *Pca*) (Taylor-Robinson *et al.*, 1993), ceci pourrait expliquer pourquoi la déplétion des cellules TregN semble avoir eu un impact bénéfique sur la résolution de l'infection dans le modèle employé par Hisaeda *et al* alors que nous n'avons pas observé de tel effet dans notre modèle d'infection par *Pca*.

Notre étude suggérait pour la première fois que les cellules TregN puissent jouer un rôle bénéfique pour l'hôte lors des infections par *Plasmodium* en permettant de contenir la réponse inflammatoire et en limitant ainsi la pathologie. Une étude ultérieure, menée avec *PbA* et allant dans le sens de nos résultats, a démontré que les cellules TregN permettent d'empêcher le développement de la MC chez les souris BALB/c (Nie *et al.*, 2007). Dans ce modèle expérimental, il semblerait que l'activation des cellules TregN (et plus particulièrement leur sécrétion d'IL-10) permette de contrôler rapidement l'activation des cellules Th1 et ainsi d'empêcher le développement de la pathologie. Dans ce contexte, l'élimination des cellules TregN conduit au développement de la MC chez 20% des souris BALB/c (contre 0% chez des souris BALB/c témoins) sans toutefois affecter la cinétique d'infection. En 2008, Couper *et al.* ont remis en question les résultats de Hisaeda *et al.* présentés précédemment (Hisaeda *et al.*, 2004; Couper *et al.*, 2008). Après avoir essayé diverses souches de souris (BALB/c et C57BL/6), diverses doses infectieuses ( $10^3$  ou  $10^4$  GR parasités par *PyL*) et différents protocoles d'élimination des cellules TregN, Couper *et al.* n'ont pas réussi à reproduire les résultats d'Hisaeda *et al.* montrant que l'activation des cellules TregN nuisait au contrôle du parasite et était responsable de la mort des souris

(Couper *et al.*, 2008). De manière conciliatoire, il a été suggéré que les résultats contrastants obtenus par ces deux études puissent reposer sur une différence au niveau de la flore gastro-intestinale des souris qui pourrait moduler le développement des cellules TregN (Strauch *et al.*, 2005; Belkaid et Tarbell, 2009; Hansen et Schofield, 2010). A la vue de ces différentes études, et ce contrairement aux premiers résultats obtenus par Hisaeda *et al.* (Hisaeda *et al.*, 2004), il semblerait que l'activation des cellules TregN soit un mécanisme protecteur mis en place pour contrôler l'inflammation et diminuer la pathologie (à la fois l'anémie (Cambos *et al.*, 2008) et la MC (Nie *et al.*, 2007)) associée aux infections par *Plasmodium*.

Toutefois, il semblerait que l'importance des TregN dans le contrôle du développement de la pathologie dépende de la souche de parasite ainsi que du bagage génétique de la souris (Tabl. 5.1). Ainsi, contrairement à l'impact positif significatif de l'activation des cellules TregN sur la pathologie associée aux infections par *PcaDS* que nous avons rapporté (Cambos *et al.*, 2008), l'élimination de ces cellules ne semble avoir aucun effet sur le développement de l'anémie lors des infections par *PyL* (Couper *et al.*, 2008). Cette différence pourrait être due au fait que le parasite *PyL* induit une inflammation moins prononcée que le *PcaDS*. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats rapportant que lors des infections par le *PcaDK*, une souche de parasite induisant une inflammation plus réduite que la souche *PcaDS*, l'élimination des cellules TregN affecte très peu le degré d'anémie. De même, le bagage génétique de la souris semble moduler l'impact des cellules TregN lors des infections par *Plasmodium*. Alors que l'élimination des cellules TregN avec un anti-CD25 favorise le développement de la malaria cérébrale chez les souris BALB/c infectées avec le *PbA*, l'absence de ces cellules chez les souris C57BL/6 provoque une diminution marquée des symptômes neurologiques tout en prolongeant leur survie. Ce traitement ne permet cependant pas de sauver les souris C57BL/6 puisqu'elles vont développer une hyperparasitémie associée à une anémie fatale (Amante *et al.*, 2007; Vigario *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2008). Chez les souris C57BL/6, l'élimination des cellules TregN amène à un meilleur contrôle du parasite en début d'infection permettant de diminuer l'accumulation des GR parasités et le recrutement des cellules T CD8<sup>+</sup> au niveau du cerveau, deux facteurs déterminants dans le développement de la MC (Amante *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2008). Il semblerait que cette diminution de la pathologie soit associée à une activation accrue des cellules T et à une production plus

importante d'IFN- $\gamma$  en début d'infection (Hansen et Schofield, 2010). Ces résultats sont cependant à interpréter avec réserve. En effet, puisque l'administration d'anti-CD25 élimine les cellules exprimant le marqueur CD25, il est possible que dans un contexte d'infection ce traitement affecte les cellules T effectrices ayant acquis l'expression de ce marqueur suite à leur activation. Même si dans les études décrites précédemment, l'administration de l'anti-CD25 est effectuée de 1 à 15 jours avant le début de l'infection et que des cellules T effectrices activées soient observables pendant l'infection, il est impossible d'exclure l'éventualité que ce traitement puisse affecter la viabilité et/ou l'activité des cellules T effectrices. Puisque de nombreuses études rapportent que la MC est due à une accumulation de cellules T activées au niveau du cerveau, il est envisageable que la diminution de la MC suite à l'administration d'anti-CD25 chez les souris C57BL/6 infectées par le *PbA* soit reliée à une altération des cellules T effectrices et non à l'élimination des cellules TregN tel que suggéré précédemment. Afin de contourner la limitation liée à l'utilisation de l'anti-CD25, des souris DEREK (de l'anglais « Depletion of Regulatory T cells ») ont été développées afin que leurs cellules FOXP3<sup>+</sup> (cellules TregN) expriment le récepteur de la toxine diphtérique. Ainsi, l'administration de cette toxine permet d'éliminer de manière spécifique les cellules TregN sans affecter les cellules T effectrices. L'utilisation de ces souris a montré que l'élimination des cellules TregN n'avait pas d'impact bénéfique sur les infections par *PbA* tant au niveau de la cinétique d'infection qu'au niveau de la pathologie (Steeg *et al.*, 2009). Au contraire, il a été noté que l'élimination des cellules TregN avait tendance à accélérer l'apparition des symptômes neurologiques et la mort des souris (Steeg *et al.*, 2009). Cette dernière étude vient donc contredire les études précédentes utilisant l'anti-CD25 lors des infections par *PbA* chez les souris C57BL/6 (Amante *et al.*, 2007; Vigario *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2008). Le rôle des cellules TregN dans le développement de la MC reste donc un sujet controversé. À la vue de ces résultats, il serait intéressant d'utiliser les souris DEREK dans notre modèle d'infection afin de confirmer les résultats obtenus suite à l'élimination des cellules TregN par l'anticorps anti-CD25.

**Tableau 5.1 : Récapitulation des études ayant évalué l'impact des cellules Treg<sup>N</sup> lors des infections par *Plasmodium* chez la souris**

Parasite	Mouse Strain	Effect on Parasitemia	Effect on Immune Responses	Effect on Severe Disease
<i>P. yoelii</i> 17X (PyL)	BALB/c	Reduction	Increased parasite-specific proliferation	Not determined
<i>P. yoelii</i> 17X (PyNL)	BALB/c	No effect	Not determined	Not determined
<i>P. yoelii</i> 17X (PyL)	C57BL/6	No effect	Not determined	No effect
<i>P. yoelii</i> 17X (PyL)	BALB/c	No effect	Not determined	No effect
<i>P. chabaudi adami</i> DS	BALB/c	Increase	Increased IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ production	Increased haemolytic anaemia
<i>P. chabaudi adami</i> DK	BALB/c	No effect	Increased IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ production	Increased haemolytic anaemia
<i>P. berghei</i> NK65	BALB/c	Delayed onset	Not determined	Not determined
<i>P. berghei</i> -ANKA	BALB/c	Reduction upon re-infection	Increased T <sub>H</sub> 1 memory responses	Increased cerebral malaria rates upon re-infection
<i>P. berghei</i> -ANKA	C57BL/6	Not determined	Not determined	Protection from cerebral malaria when depletion was carried out 2 days before parasitic challenge. No effect when depletion was carried out 30 days before challenge.
<i>P. berghei</i> -ANKA	C57BL/6	Reduction	Enhanced T cell activation and IFN- $\gamma$ responses	Protection from cerebral malaria when depletion was carried out 2 and 14 days prior to parasitic challenge
<i>P. berghei</i> -ANKA	CBA	Reduction	Not determined	Protection from cerebral malaria when depletion was carried out 14 days prior to challenge
<i>P. berghei</i> -ANKA	C57BL/6	No effect	Enhanced T cell activation	No effect

Source : (Hansen et Schofield, 2010)



Plusieurs études ont aussi évalué le rôle des cellules TregN chez des patients atteints de la malaria mais de nombreux facteurs dont la présence éventuelle d'infections multiples chez les patients, la variabilité génétique, l'âge ainsi que la région de résidence compliquent l'interprétation de ces résultats (Tabl. 5.2). La plupart des études révèlent une corrélation entre le nombre de cellules TregN dans le sang des patients, la sévérité des symptômes de la maladie et la parasitémie (Walther *et al.*, 2005; Todryk *et al.*, 2008; Minigo *et al.*, 2009). Cependant, aucune étude n'a prouvé que l'activation des cellules TregN soit responsable de la pathologie exacerbée et du contrôle moins efficace du parasite chez ces patients. Les TLR étant connus pour induire l'activation et la prolifération des cellules TregN, il a été proposé que la stimulation du TLR9 et du TLR2 (par l'HZ et le GPI respectivement) pourrait être impliquée dans l'activation des cellules TregN pendant les infections par *Plasmodium* (Gazzinelli et Denkers, 2006).

Malgré le nombre important d'études citées à l'instant, le rôle des cellules TregN semble assez modeste lors des infections par *Plasmodium*. A l'exception de l'étude de Hisaeda *et al.* où la déplétion des TregN a permis d'augmenter considérablement l'efficacité de la réponse contre le *Plasmodium*, les autres études ont suggéré un rôle mineur pour ces cellules dans le contrôle de la pathologie ou de la réponse antiparasite. Certaines études indiquent que les cellules TregI pourraient, elles aussi, jouer un rôle dans le contrôle de la pathologie et du parasite lors des infections par *Plasmodium*. Dans ce contexte, Wong *et al.* ont rapporté que les infections par *Plasmodium* génèrent des CD régulatrices capables d'induire des cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IL-10 ayant un phénotype semblable aux cellules Tr1 (Wong et Rodriguez, 2008). Lors des infections par PyL, il a aussi été observé que l'activation d'une population de cellules TregI interfère avec le contrôle efficace du parasite en sécrétant de l'IL-10 (Couper *et al.*, 2008). De leur côté, Riley *et al.* ont démontré que les antigènes de *Plasmodium falciparum* activent des cellules TregI exprimant le marqueur CD8 et étant responsables de l'inhibition de la prolifération des cellules mononucléaires périphériques du sang de certains patients atteints de la malaria (Riley *et al.*, 1989; Riley, Jobe et Whittle, 1989).



Tableau 5.2: Récapitulation des études ayant évalué l'impact des cellules TregN lors des infections par *Plasmodium* chez l'homme

Population	Expansion in Infection	Association	Immunosuppressive Activity
Experimental sporozoite infection of volunteers	Frequency of $T_{reg}$ cells increased after experimental exposure	Percentage of $T_{reg}$ cells in PBMCs inversely correlated with onset of high parasite density	$T_{reg}$ cells from infected volunteers were found to inhibit in vitro proliferative responses
Volunteers from Kenya	Not determined	Increased $T_{reg}$ cell numbers in peripheral blood was associated with increased risk of clinical malaria	Not determined
Fulani and Mossi volunteers	Percentage of $T_{reg}$ cells was higher in Mossi than Fulani individuals	High resistance to malaria in Fulani individuals correlates with a functional deficit of $T_{reg}$ cells	Lower immunosuppressive activity in malaria-resistant Fulani individuals
Gambian children with severe or uncomplicated malaria	Increased number of $T_{reg}$ cells in severe and uncomplicated malaria during convalescence	Frequency of $T_{reg}$ cells negatively associated with the magnitude of $T_H1$ memory responses	Similar immunosuppressive function in cases with severe and uncomplicated malaria
Adult volunteers from Papua with severe or uncomplicated malaria	Increased number of $T_{reg}$ cell in malaria patients relative to asymptomatic controls	$T_{reg}$ cell frequency associated with parasite biomass in severe but not uncomplicated malaria cases	Severe malaria cases were characterised by occurrence of a $T_{reg}$ cell subset expressing high levels of TNFR1 and Foxp3 with strong immunosuppressive function
Volunteers with acute <i>P. vivax</i> infection in Thailand	Significant expansion during acute infection	Not determined	Not determined

Source : (Hansen et Schofield, 2010)

### 5.1.2. Implication des MP dans l'inhibition des cellules T lors des infections par *Plasmodium*

Plusieurs études ont suggéré que la suppression des cellules T lors des infections par *Plasmodium* serait induite par des cellules ayant un phénotype rappelant celui des MP (Warren et Weidanz, 1976; Correa, Narayanan et Miller, 1980; Luyendyk *et al.*, 2002). Bien que des études suggèrent l'implication de facteurs solubles produits par les MP (Scorza *et al.*, 1999; Luyendyk *et al.*, 2002), il n'est pas exclu que la stimulation de certains récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules T soit aussi impliquée. Le caractère suppressif des MP semble être proportionnel à la parasitémie (Mahajan *et al.*, 1986; Ahvazi, Jacobs et Stevenson, 1995; Scorza *et al.*, 1999) et induit suite à l'ingestion d'HZ (Morakote et Justus, 1988; Scorza *et al.*, 1999). L'identité des facteurs solubles responsables de l'inhibition des cellules T reste controversée. D'une part, des études ont rapporté que l'inhibition pouvait être réduite voire éliminée par l'ajout d'indométhacine et/ou de L-NG-monométhyle arginine (L-NMMA) suggérant ainsi l'implication des PGE et/ou du NO (Riley *et al.*, 1989; Rockett *et al.*, 1994; Ahvazi, Jacobs et Stevenson, 1995). D'autre part, deux études plus récentes ont démontré que la suppression des cellules T par les MP était due à la sécrétion de facteurs solubles autres que la PGE2, le NO, le TGF- $\beta$  ou encore l'IL-10 (Scorza *et al.*, 1999; Luyendyk *et al.*, 2002). L'utilisation de modèles expérimentaux différents (parasite / hôte / origine des MP) serait à l'origine de ces résultats contrastants.

L'activation des cellules T peut aussi être modulée par la stimulation de récepteurs membranaires inhibiteurs. Dans ce contexte, la stimulation des récepteurs CTLA-4 et PD-1 par les molécules CD80/CD86 ou PD-1L/PD-2L respectivement inhibe l'activation des cellules T (Alegre, Frauwirth et Thompson, 2001; Keir *et al.*, 2008). En particulier, l'interaction de ces récepteurs avec leur ligand provoque une inhibition de la prolifération et de la sécrétion de cytokines des cellules T en réponse à la stimulation via leur TCR (Freeman *et al.*, 2000; Vaidya et Pearce, 2004; Parry *et al.*, 2005; Trautmann *et al.*, 2006). Plusieurs études rapportent que les infections par *Plasmodium* sont associées à une expression importante du récepteur CTLA-4 à la surface des cellules T (principalement les cellules CD4<sup>+</sup>) (Jacobs *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2004; Lepenies *et al.*, 2007). Lors des infections de souris C57BL/6 par le *PbA*, la neutralisation de ce récepteur avec un

anticorps anti-CTLA-4 a provoqué une exacerbation de la pathologie et une mort prématurée des souris sans permettre de ralentir le développement du parasite (Jacobs *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2004). La pathologie excessive suite à la neutralisation du CTLA-4 semble dépendre d'une sur-activation des cellules T CD4<sup>+</sup> ainsi que de la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  (Jacobs *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2004). Une étude similaire menée avec des souche virulente et non virulente de *Py* a abouti à des conclusions similaires (Lepenies *et al.*, 2007). Ainsi, il semblerait que la stimulation du récepteur CTLA-4 puisse être impliquée dans la suppression affectant les cellules T pendant les infections par *Plasmodium* (Cambos *et al.*, 2008). De plus, il semblerait que ce processus permette de contrôler l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> afin d'éviter le développement d'une inflammation et d'une pathologie excessive sans toutefois interférer de façon importante avec le contrôle du parasite. Le rôle protecteur du CTLA-4 semble d'autant plus important lors des infections par des parasites virulents (Jacobs *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2004; Lepenies *et al.*, 2007).

A notre connaissance, aucun article n'a étudié l'expression du récepteur PD-1 lors des infections par *Plasmodium*. Des expériences préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont démontré que le PD-1 était fortement exprimé par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de la rate de souris infectées par *PcaDS* et *PcaDK* au pic d'infection (résultats non publiés). De manière intéressante, les infections virales chroniques sont caractérisées par la présence de cellules T « fatiguées » (pour l'anglais « exhausted ») exprimant fortement le récepteur PD-1 et ayant perdu leur capacité à proliférer et à sécréter diverses cytokines rappelant fortement le phénotype des cellules T provenant de souris infectées par *Pca* (Barber *et al.*, 2006; Blattman et Greenberg, 2006; Trautmann *et al.*, 2006). Barber *et al.* ont démontré que, lors des infections chroniques par le virus lymphocytaire choriomeningitis (LCMV), l'utilisation d'anticorps anti-PD-1 afin de neutraliser l'activation de ce récepteur par son ligand, permet aux cellules T CD8<sup>+</sup> « fatiguées » de retrouver leur capacité à proliférer et à sécréter diverses cytokines dont l'IFN- $\gamma$ . (Barber *et al.*, 2006). De plus, la neutralisation du PD-1 permet de réduire la charge virale et de résoudre l'infection. Trautmann *et al.* sont arrivés à des conclusions similaires lors d'infections avec le VIH (Trautmann *et al.*, 2006). À la vue des similarités entre l'inhibition affectant les cellules T lors des infections virales chroniques et lors des infections par *Plasmodium*, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la neutralisation

du PD-1 pendant la malaria afin d'étudier l'importance de ce récepteur dans la suppression des cellules T et dans la résolution de l'infection. De manière surprenante, les cellules T provenant de souris infectées par le *Pca* sont capables de sécréter des quantités normales d'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation de leur TCR alors que la sécrétion d'IL-2 et la prolifération sont fortement inhibées (Cambos *et al.*, 2008). Cette particularité n'entre pas en désaccord avec l'hypothèse selon laquelle la stimulation du PD-1 serait responsable de l'inhibition affectant les cellules T pendant les infections par *Plasmodium*. En effet, suite à la stimulation de ce récepteur, les cellules T deviennent progressivement dysfonctionnelles et la perte de la capacité à produire l'IFN- $\gamma$  est l'une des dernières étapes de ce processus apparaissant après l'inhibition de la prolifération et de la sécrétion d'IL-2 (Blattman et Greenberg, 2006). A l'instar du récepteur CTLA-4, la stimulation du PD-1 pourrait représenter un mécanisme protecteur permettant de limiter l'activation excessive des cellules T et de diminuer la pathologie associée à certaines infections (Barber *et al.*, 2006; Lepenies *et al.*, 2007).

Bien que les cellules TregN ne semblent pas impliquées dans la suppression affectant les cellules T lors des infections par *Pca*, l'activation de ces dernières semble permettre de limiter l'inflammation et le développement de l'anémie (Cambos *et al.*, 2008). En diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des cellules TregN permettrait de réduire la détérioration et la lyse des GR sains, d'inhiber l'activité phagocytaire des MP (ralentissant ainsi l'élimination des GR abîmés) ainsi que de favoriser l'érythropoïèse au niveau de la moelle osseuse (Chang et Stevenson, 2004). Bien que l'activation des cellules TregN semble limiter l'anémie lors des infections par *Plasmodium*, d'autres mécanismes comme l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 tendent à inhiber l'érythropoïèse et à favoriser le développement de cette pathologie. Notre second axe de recherche a permis de démontrer que l'ingestion d'HZ et d'HE par les MP serait à l'origine de l'inhibition de leur sécrétion d'IL-12 permettant ainsi d'identifier les facteurs potentiellement responsables de la dysérythropoïèse observée pendant les infections par *Plasmodium*.

## 5.2. Modulation de la sécrétion d'IL-12 des macrophages lors de la malaria

Les infections par *Plasmodium* sont reconnues pour être associées à une inhibition de la sécrétion d'IL-12 des MP (voir sect. 1.3). A la vue du rôle primordial de l'IL-12 dans le processus érythropoïétique et dans le contrôle du parasite, il est important de mieux comprendre les mécanismes aboutissant à son inhibition pendant la malaria. Dans cette étude, nous avons démontré que l'ingestion d'HE et d'HZ inhibe de la sécrétion d'IL-12 des MP suite à la stimulation du TLR4 avec le LPS ou avec la combinaison IFN- $\gamma$ /LPS (Cambos *et al.*, 2010). Les MP internalisant des quantités importantes d'HZ et d'HE lors des infections par *Plasmodium*, l'accumulation intracellulaire de ces composés ferriques et/ou de leurs produits de dégradation (Nagababu et Rifkind, 2000; Nagababu et Rifkind, 2004) pourrait être impliquée dans l'inhibition de l'IL-12 pendant la malaria. Néanmoins, notre étude *in vitro* ne reflète pas toute la complexité des infections par *Plasmodium*. En effet, l'HZ et l'HE sont ingérées simultanément lors des infections par *Plasmodium*. Étant donné que ces composés agissent de manière différente sur le niveau de GSH intracellulaire et sur la production d'IL-10 (Cambos *et al.*, 2010), il est important d'évaluer si leur ingestion simultanée donne lieu à des effets synergiques ou antagoniques sur la sécrétion d'IL-12 des MP. Ensuite, il sera important de déterminer le mécanisme conduisant à l'activation de la sécrétion d'IL-12 pendant les infections par *Plasmodium* afin de pouvoir évaluer le pouvoir inhibiteur de l'HE et de l'HZ sur la sécrétion d'IL-12 induite par ce type de stimulation. Il a été suggéré que le GPI exprimé à la surface de *Plasmodium* semble impliqué dans l'activation des TLR2 et 4 alors que l'HZ et/ou l'ADN du parasite pourraient se lier au TLR9 (Coban *et al.*, 2005; Krishnegowda *et al.*, 2005; Campino *et al.*, 2009; Shio *et al.*, 2010). Il n'est pas exclu non plus que la stimulation de CD40 par son ligand, lors de l'interaction entre les MP et les cellules T, puisse aussi être impliquée dans l'induction d'IL-12 pendant la malaria. Des expériences préliminaires ont montré que l'induction de la sécrétion d'IL-12 via la stimulation du TLR2 par le Pam3Cys4 est elle aussi affectée par l'HZ démontrant que l'effet inhibiteur de ce biocristal n'est pas limité à la stimulation des MP par le LPS (Scorza T., résultats non publiés).



De manière intéressante, l'inhibition de la signalisation via le TLR4 par l'HZ et l'HE pourrait avoir des répercussions sur l'efficacité de la réponse inflammatoire dirigée contre d'autres pathogènes. En particulier, ce phénomène pourrait être à l'origine de la sensibilité accrue des patients atteints de la malaria aux infections par certaines bactéries comme les *Salmonelles* (Mabey, Brown et Greenwood, 1987).

### 5.2.1. Effets associés à l'HZ

Dans notre étude, nous avons démontré que l'HZ inhibe la sécrétion d'IL-12 des BMDM en réponse au LPS ou à une combinaison IFN- $\gamma$ /LPS (Cambos *et al.*, 2010). Dans ces conditions, la manière dont l'HZ module la sécrétion d'IL-12 reste incertaine et semble indépendante de l'activation de la MAPK p38, de l'induction d'un stress oxydatif et de la sécrétion d'IL-10 (Cambos *et al.*, 2010).

De manière générale, la façon dont l'HZ agit sur la physiologie des phagocytes reste mal connue. Certaines études indiquent que les effets de l'HZ sont dus à la génération de ROS (Taramelli *et al.*, 1995; Taramelli *et al.*, 2000) qui pourrait moduler certaines voies métaboliques dont les voies MAPK ERK1/2 (de l'anglais « extracellular signal-regulated kinases 1/2 ») et NF $\kappa$ B (Jaramillo *et al.*, 2003; Jaramillo, Godbout et Olivier, 2005). Il est important de noter que la production de ROS induite par l'HZ est transitoire et disparaît après quelques heures d'incubation (Cambos *et al.*, 2010; Shio *et al.*, 2010). Notre étude évaluant l'effet d'un prétraitement de 24 h avec l'HZ sur la production d'IL-12 des MP, il est peu probable que les ROS induits dans les premières heures de contact avec le biocristal soient responsables de l'inhibition de cette cytokine. Cependant, il est envisageable que ces ROS aient modifié la physiologie des MP et que cela ait des répercussions sur l'induction de la production d'IL-12 même 24 h après le début du prétraitement avec l'HZ. La neutralisation des ROS lors de premières heures de prétraitement avec l'HZ pourrait permettre de clarifier ce point.

Nos résultats suggèrent qu'après quelques heures d'incubation avec l'HZ, le niveau de GSH intracellulaire augmente et la production basale de ROS diminue (Cambos *et al.*, 2010). Cet effet provient vraisemblablement de l'inhibition de l'assemblage membranaire de la

NADPH oxydase, la source majeure de ROS chez les phagocytes, par un mécanisme impliquant l'inhibition de la PKC (Schwarzer et Arese, 1996) (Fig. 1.13). A la vue du rôle clef des ROS dans l'activation du NF $\kappa$ B (Gloire, Legrand-Poels et Piette, 2006) et dans l'induction de la signalisation cellulaire découlant de la reconnaissance du LPS par le TLR4 (Triantafilou *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004), l'inhibition de la NADPH oxydase par l'HZ pourrait avoir des répercussions importantes sur la sécrétion d'IL-12 des MP. Afin de confirmer cette hypothèse, l'activation de la NADPH oxydase et la synthèse de ROS suite à la stimulation par le LPS ou la combinaison IFN- $\gamma$ /LPS pourraient être évaluées chez des MP prétraités à l'HZ. D'autre part, une étude récente réalisée dans notre laboratoire (Scorza T, résultats non publiés) révèle une inhibition de l'expression membranaire des TLR4 et TLR2 chez les MP traités avec l'HZ. Après 8 h d'incubation, l'expression de ces récepteurs chute de 30 à 40% et ceci est en corrélation directe avec la chute progressive des ROS. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la production de ROS par l'HZ pourrait affecter l'expression de certains TLR et/ou leur translocation au niveau de la membrane, ce qui pourrait être impliqué dans la réponse réduite des MP à la stimulation par le LPS observée dans notre étude.

L'HZ pourrait aussi inhiber la production d'IL-12 des MP en induisant une tolérance au LPS (West et Heagy, 2002). Dans les modèles de choc endotoxique, le LPS provoque la sécrétion importante de diverses cytokines pro-inflammatoires par les MP ce qui entraîne le développement de graves lésions pouvant conduire à la mort des souris (Cross, 2002; Luan *et al.*, 2007). La pré-exposition des souris à des doses faibles de LPS permet à ces dernières de survivre à des doses normalement létales de cette même endotoxine. Ce phénomène est connu sous le nom de tolérance au LPS et est dû au fait que suite à une première exposition à l'endotoxine, les MP deviennent réfractaires à la stimulation et produisent peu de cytokines pro-inflammatoires (Varma *et al.*, 2001; Wysocka *et al.*, 2001; Cross, 2002; Dobrovolskaia et Vogel, 2002; Sato *et al.*, 2002). De manière intéressante, la stimulation de TLR autres que le TLR4 peut induire une tolérance des MP au LPS (Sato *et al.*, 2002). Bien que cela reste controversé, certaines études indiquent que l'HZ serait capable d'activer le TLR9 (Coban *et al.*, 2005). Ainsi, il est envisageable que la stimulation de ce récepteur durant le prétraitement des MP avec l'HZ puisse induire une tolérance au LPS qui serait responsable de l'inhibition de la production d'IL-12 observée dans notre étude (Cambos *et al.*, 2010). Cette hypothèse

est supportée par une étude ayant rapporté que les infections par *Plasmodium* semblent induire une tolérance au LPS chez les CD et que l'intensité de l'inhibition affectant ces cellules est en corrélation directe avec la quantité d'HZ qu'elles ont ingérée (Perry *et al.*, 2005). Les monocytes et les MP internalisant eux aussi des quantités importantes d'HZ lors des infections par *Plasmodium*, il est probable que les observations de Perry *et al.* soient extrapolables aux différents phagocytes. Afin de confirmer cette théorie, l'inhibition de la production d'autres cytokines pro-inflammatoires sécrétées en réponse au LPS (comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8) devra être évaluée suite au prétraitement des MP par l'HZ. Des observations préliminaires, nécessitant de plus amples approfondissements, nous ont permis de montrer que le prétraitement avec l'HZ n'inhibait pas la production de TNF- $\alpha$  en réponse au LPS. Afin de confirmer ou d'infirmer l'implication de la tolérance au LPS dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 par l'HZ, il serait intéressant d'évaluer l'effet inhibiteur de ce biocristal chez des souris TLR9<sup>-/-</sup>.

### 5.2.2. Effets associés à l'HE

Nous avons démontré que l'HE inhibe la sécrétion d'IL-12 suite à la stimulation avec la combinaison IFN- $\gamma$ /LPS en interférant principalement avec l'effet synergique de l'IFN- $\gamma$  (Cambos *et al.*, 2010). Plus précisément, le pouvoir inhibiteur de l'HE sur la sécrétion d'IL-12 semble dépendre de sa capacité à interférer avec la réduction de la sécrétion d'IL-10 par l'IFN- $\gamma$  (Cambos *et al.*, 2010). Étant donné que l'IFN- $\gamma$  diminue la sécrétion d'IL-10 en réponse au LPS en inhibant l'activation des MAPK p38 et ERK-1/2 ainsi que de la voie de signalisation AKT/PI3K, nous proposons que l'HE interfère avec ces processus (Hu *et al.*, 2006; Saraiva et O'Garra, 2010). Bien que nos résultats démontrent que l'activation de la MAPK p38 soit impliquée dans l'inhibition de l'IL-12 par l'HE, il serait intéressant d'évaluer si l'inactivation des voies ERK-1/2 et AKT/PI3K par l'IFN- $\gamma$  est elle aussi affectée par ce composé ferrique.

Bien que l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 des MP par l'HE dépende du stress oxydatif, de la sécrétion accrue d'IL-10 et de la MAPK p38, le mécanisme précis conduisant à ces modulations reste à déterminer (Cambos *et al.*, 2010). L'HE étant un inducteur puissant



de la HO-1, l'activité de cette enzyme pourrait être impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 des MP en réponse à la stimulation IFN- $\gamma$ /LPS. Diverses pathologies résultant d'agressions oxydatives ou inflammatoires sont associées à une induction de la HO-1 (Choi et Alam, 1996; Maines, 1997; Galbraith, 1999; Otterbein et Choi, 2000; Wagener *et al.*, 2003; Rushworth et O'Connell, 2004) et de nombreuses études accordent des propriétés anti-inflammatoires à cette enzyme (Wagener *et al.*, 2003). En particulier, il a été observé que les souris déficientes en HO-1 ont une activation accrue de NF $\kappa$ B suite au traitement avec de l'Hb (Nath *et al.*, 2001). De plus, la HO-1 est capable de diminuer la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  des monocytes traités avec des LDL oxydés (Ma *et al.*, 2007) ou du LPS (Drechsler *et al.*, 2006) en activant la MAPK p38 et en inhibant NF $\kappa$ B. L'IL-12 étant une cytokine pro-inflammatoire dont l'expression est en partie contrôlée par la MAPK p38 et le facteur de transcription NF $\kappa$ B, ces études confirment que l'activation de la HO-1 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de cette cytokine par l'HE. Les effets anti-inflammatoires de la HO-1 semblent plus particulièrement dus au CO produit suite à la dégradation de l'HE et ayant la capacité de moduler l'activation de la MAPK p38 et du NF $\kappa$ B (Otterbein *et al.*, 2000; Morse *et al.*, 2003; Wagener *et al.*, 2003; Hegazi *et al.*, 2005). En particulier, il semblerait que le CO empêche l'activation de la NADPH oxydase nécessaire à la migration du TLR4 au niveau des radeaux lipidiques et à l'activation du NF $\kappa$ B et des MAPK suite à la reconnaissance du LPS (Nakahira *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont démontré que la sécrétion d'IL-12 est régulée par l'activation de la HO-1 et/ou la présence de CO. Ainsi, Hegazi *et al.* ont montré que l'administration de CO est capable de réduire l'inflammation associée aux colites induites par une réponse de type Th1 exagérée en provoquant une diminution significative de l'IL-12 et du TNF- $\alpha$  dans les sécrétions intestinales (Hegazi *et al.*, 2005). Des expériences *in vitro* additionnelles ont démontré que le CO diminue la sécrétion d'IL-12 par les MP en réponse à la stimulation IFN- $\gamma$ /LPS. Dans cette étude, le CO affecte principalement l'effet synergique de l'IFN- $\gamma$  sur la production d'IL-12 induite par le LPS, ce qui rappelle fortement nos résultats obtenus avec l'HE (Hegazi *et al.*, 2005; Cambos *et al.*, 2010). Cependant, l'effet inhibiteur du CO semble indépendant de l'IL-10, de la MAPK p38 ainsi que du NO (Hegazi *et al.*, 2005). Des études similaires menées avec des CD ont montré que l'activation de la HO-1 avec la cobalt

protoporphyrine IX (CoPPIX) conduisait à une inhibition de la sécrétion d'IL-12 en réponse au LPS (Chauveau *et al.*, 2005; Remy *et al.*, 2009). Cette inhibition est associée à une diminution de la production de ROS par les CD (Chauveau *et al.*, 2005) et dépend d'une réduction de l'activation du NF $\kappa$ B et de l'IRF3 (Remy *et al.*, 2009). A la vue de ces études, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la neutralisation de la HO-1 sur l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 des MP par l'HE.

Comme décrit précédemment, l'inhibition de l'IL-12 par l'HE est associée à une augmentation de la sécrétion de l'IL-10. En plus d'être responsable de l'inhibition de la sécrétion de l'IL-12, l'augmentation de la production d'IL-10 par les MP pourrait avoir d'autres répercussions sur l'infection par *Plasmodium*. D'une part, la sécrétion d'IL-10 induite par l'HE pourrait influencer le développement de l'anémie. Une étude rapporte notamment que, pendant les pathologies inflammatoires, l'IL-10 favorise le développement de l'anémie en limitant la disponibilité du fer pour les progéniteurs érythropoïétiques (Tilg *et al.*, 2002). La malaria étant une pathologie inflammatoire associée à une anémie sévère, il est envisageable que la sécrétion d'IL-10 induite par l'HE soit impliquée dans la dysérythropoïèse observée lors des infections par *Plasmodium*. En revanche, d'autres études ont rapporté que l'IL-10 pourrait stimuler l'érythropoïèse *in vitro* (Wang, Udupa et Lipschitz, 1996) et que sa présence en faible quantité serait associée à des cas d'anémies sévères chez les patients atteints de la malaria (Othoro *et al.*, 1999; Nussenblatt *et al.*, 2001; Lyke *et al.*, 2004; Ageely, Dawoud et Heiba, 2008; Ouma *et al.*, 2008). D'autre part, l'IL-10 est aussi connue pour ses propriétés immunosuppressives et pourrait limiter la réponse antiparasite (Asadullah, Sterry et Volk, 2003). Bien que la présence de cette cytokine soit nécessaire à la résolution des infections par *Plasmodium* sans pathologie excessive (Li *et al.*, 2003), son augmentation suite à l'ingestion d'HE par les MP pourrait favoriser le développement du parasite et conduire à la mort des souris (Couper *et al.*, 2008). Le but de notre étude n'étant pas d'évaluer l'impact de la modulation de l'IL-10 par l'HE, cette partie ne sera pas traitée plus en détails.

Lors des infections par *Plasmodium*, divers composés ferriques dont l’HZ, l’HE et l’Hb sont ingérés par les MP via la phagocytose de GR parasités ou abîmés ainsi que via l’ingestion d’HE ou d’Hb libérées dans le sang. D’une part, notre étude a démontré que l’ingestion d’HZ et d’HE inhibe la sécrétion d’IL-12 des MP. D’autre part, diverses études ont aussi rapporté que l’internalisation d’HZ ou d’Hb cause de nombreuses dysfonctions des phagocytes (voir par. 1.3.2.3). Ainsi, il semblerait que l’accumulation intracellulaire de ces composés ferriques affecte divers aspects de la physiologie des MP. À la vue du large spectre des dysfonctions affectant les MP, il est envisageable que l’accumulation de ces composés ferriques affecte la viabilité des MP. Notre troisième axe de recherche, évaluant l’impact d’une érythrophagocytose importante sur la viabilité des MP, a permis de confirmer que l’internalisation de quantités importantes d’Hb et d’HE induit l’apoptose des phagocytes (Cambos et Scorza, 2011).

### 5.3. Érythrophagocytose et viabilité des macrophages

#### 5.3.1. Effet de l'HZ sur l'apoptose des MP pendant les infections par *Plasmodium*

Pendant les infections par *Plasmodium*, les MP phagocytent des quantités importantes de GR non-parasités contenant de l'Hb et de GR parasités contenant un mélange d'Hb et d'HZ. Ainsi, lors des infections par *Plasmodium*, les MP ingèrent de l'Hb, dont l'HE va induire l'apoptose (Cambos et Scorza, 2011), mais aussi de l'HZ dont le rôle n'a pas été caractérisé dans notre étude. Une fois phagocytée, l'HZ s'accumule dans les lysosomes des MP où elle persiste pendant de longues périodes (Schwarzer *et al.*, 1999). Bien que suite à l'ingestion de l'HZ, les MP restent capables de dégrader l'HE libre via l'activation de la HO-1, l'HE complexé sous forme d'HZ n'est pas éliminée. Les phagocytes semblent incapables de dissocier le biocrystal d'HZ et de libérer les molécules d'HE rendant ainsi impossible l'activité enzymatique de la HO-1 (Schwarzer *et al.*, 1999; Taramelli *et al.*, 2000). Bien que de nombreuses études aient démontré que l'ingestion d'HZ affecte diverses fonctions effectrices des phagocytes (voir par. 1.3.2.3), ce composé ferrique ne semble pas diminuer la viabilité des MP (résultats non publiés et (Scorza *et al.*, 1999)). De manière intéressante, nous avons observé que l'HZ semble augmenter sensiblement la viabilité des MP de la lignée J774A.1 *in vitro* (résultats non publiés). Ainsi, il est envisageable que l'HZ provenant des GR parasités puisse tempérer le pouvoir pro-apoptotique de l'HE et limiter l'apoptose des MP suite à l'érythrophagocytose lors des infections par *Plasmodium*. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le traitement des MP avec des GR de souris infectées par le *PcaDS* (GRDS) (contenant de l'HZ) a tendance à induire un niveau d'apoptose moins prononcé que le traitement avec des GR oxydés pour des ratios MP : GR identiques et des niveaux de phagocytose similaires. En revanche, il est possible que le pouvoir pro-apoptotique plus restreint des GRDS soit dû au fait que, suite au développement du parasite, les GR parasités contiennent moins d'Hb que les GR non parasités et qu'ils génèrent par conséquent moins d'HE libre suite à leur digestion lors de l'érythrophagocytose. Afin de confirmer le rôle anti-apoptotique de l'HZ lors de l'érythrophagocytose, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'un prétraitement avec de l'HZ sur le niveau d'apoptose induit par des GR oxydés ou par l'HE.

Étant donné que l’HZ est capable d’augmenter le ratio GSH/GSSG et de diminuer la production basale de ROS des MP (Schwarzer et Arese, 1996; Cambos *et al.*, 2010; Cambos et Scorza, 2011), il est envisageable que son pouvoir antioxydant puisse réduire le stress oxydatif généré suite à l’érythrophagocytose et ainsi diminuer l’apoptose des MP. Le pouvoir antioxydant de l’HZ proviendrait vraisemblablement de sa capacité à inhiber la NADPH oxydase comme décrit précédemment (Schwarzer et Arese, 1996). De plus, il a été suggéré que l’HZ pourrait piéger l’HE libérée suite à la dégradation de l’Hb des GR dans les phagosomes et ainsi empêcher sa libération dans le cytoplasme (Schwarzer *et al.*, 1999). Bien que cela reste à démontrer expérimentalement, la rétention de l’HE dans les phagosomes par l’HZ pourrait limiter la libération d’HE dans le cytoplasme et ainsi réduire le stress oxydatif et l’apoptose des MP suite à une érythrophagocytose importante. De manière intéressante, l’HZ semble aussi inhiber l’activité phagocytaire des MP selon un mécanisme non déterminé pour le moment (Schwarzer *et al.*, 1992; Loegering *et al.*, 1996). Ainsi, pendant les infections par *Plasmodium*, l’ingestion de GR parasités (contenant de l’HZ) pourrait ralentir la phagocytose ultérieure d’autres GR et ainsi retarder l’internalisation de l’HE et l’intoxication des MP.

### 5.3.2. Réflexion sur les mécanismes conduisant à l’apoptose des MP

Comme décrit précédemment, les MP du RES sont responsables de l’élimination des GR sénescents et/ou abîmés suite aux infections ou à divers stress (voir art. 1.4.1 et 1.4.2). Bien que ce processus génère des ROS potentiellement toxiques pour les MP, dans des conditions physiologiques normales où la phagocytose de GR est réduite, le nombre de MP apoptotiques est faible (Helmby, Jonsson et Troye-Blomberg, 2000). Ces observations obtenues *in vivo* ont été corroborées *in vitro* dans notre étude et par d’autres équipes de recherche (Kondo *et al.*, 1988; Commins, Loegering et Gudewicz, 1990; Loegering *et al.*, 1996; Delaby *et al.*, 2005). La survie des MP est vraisemblablement permise grâce aux diverses défenses antioxydantes des MP. Pour une liste exhaustive, se référer aux articles suivants (Kohen et Nyska, 2002; Trachootham, Alexandre et Huang, 2009) et à la figure 5.1. L’apoptose que nous avons mesurée suite à une érythrophagocytose soutenue (Cambos et Scorza, 2011) reflète vraisemblablement une incapacité de ces mécanismes protecteurs à

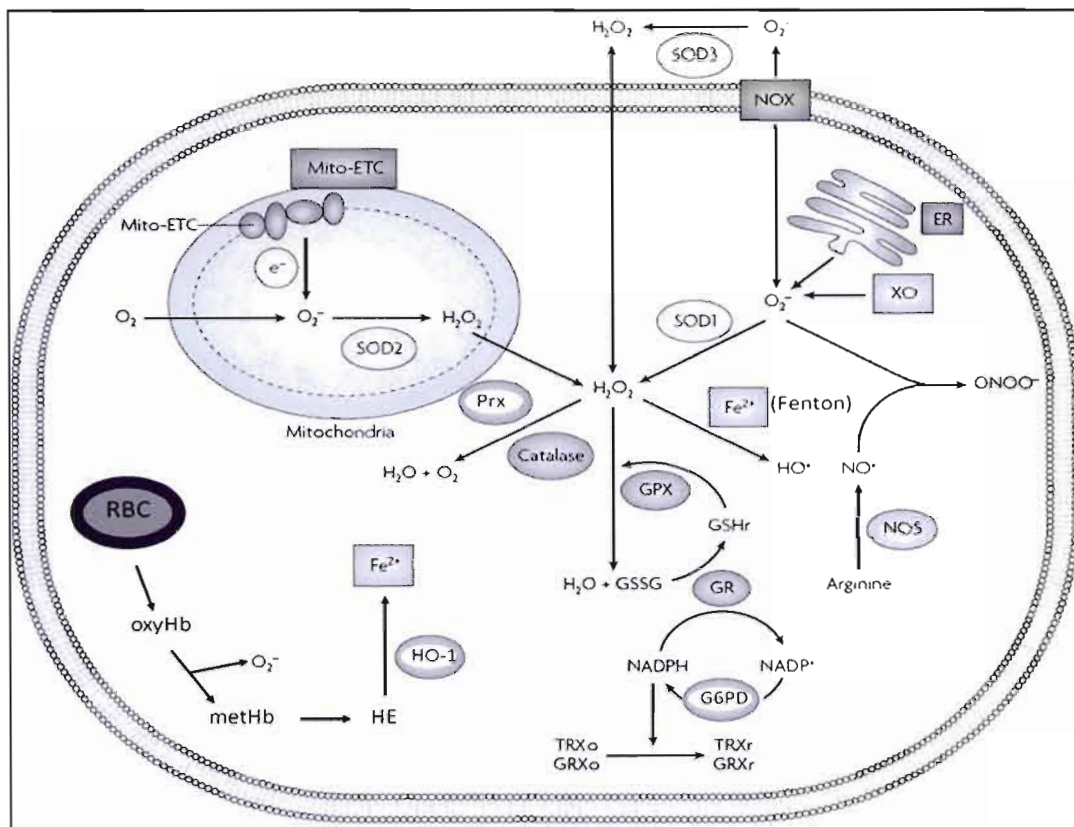
contrôler efficacement le stress oxydatif induit suite à l'ingestion et à la dégradation d'un nombre important de GR. Ceci pourrait résulter soit de la génération d'une quantité trop importante de ROS conduisant à la saturation des capacités de détoxification de ces systèmes, soit de l'inhibition de certains mécanismes protecteurs suite à l'érythrophagocytose. En effet, il est possible que la phagocytose de nombreux GR inhibe l'expression ou l'activité de certaines enzymes impliquées dans le contrôle des ROS. Bien que nos résultats démontrent que l'expression de la HO-1 ne soit pas affectée, il est envisageable que son activité enzymatique soit inhibée suite à l'érythrophagocytose. De plus, il n'est pas exclu que d'autres enzymes comme la catalase, la GSH peroxydase ou d'autres antioxydants intracellulaires puissent être inhibés par l'érythrophagocytose rendant ainsi les MP vulnérables aux attaques oxydatives.

Dans un contexte d'érythrophagocytose soutenue, une accumulation intracellulaire importante de fer libre dans les MP pourrait contribuer à accroître le stress oxydatif et provoquer l'apoptose. Une étude menée *in vitro* a démontré que l'ingestion de GR induit des changements dans la physiologie des MP (Gemsal *et al.*, 1973). Ainsi, il a été démontré que les deux tiers du fer provenant de la dégradation des GR sont excrétés dans les premières heures suivant le début de l'érythrophagocytose. Cette excrétion massive de fer est permise par l'induction de la ferroportine. Après quelques heures, l'expression de ce transporteur du fer est inhibée et le reste du fer provenant des GR est stocké intracellulairement suite à sa neutralisation par la ferritine. Dans des conditions physiologiques normales où les MP phagocytent rarement plusieurs GR à la fois, ces résultats suggèrent que la majorité du fer provenant de la dégradation des GR est excrétée rapidement permettant ainsi de limiter la quantité de fer intracellulaire. En revanche, dans des conditions d'érythrophagocytose soutenue où les MP phagocytent successivement plusieurs GR, ces résultats indiquent que la majorité du fer sera stockée dans les MP à cause de l'inhibition rapide de la ferroportine après la phagocytose des premiers GR. Dans ces conditions, les MP accumuleraient des quantités importantes de fer qui pourraient éventuellement dépasser les capacités de neutralisation de la ferritine. L'accumulation de fer libre au sein des MP pourrait accroître significativement le stress oxydatif produit suite à la digestion des GR en générant des OH<sup>•</sup> selon la réaction de Fenton (Kohen et Nyska, 2002) (Fig. 1.8). La forte réactivité des OH<sup>•</sup>

pourrait causer des dégâts importants et être responsable de l'apoptose des MP (Kohen et Nyska, 2002). Cette hypothèse est supportée par une étude de Balla *et al.* ayant démontré que l'administration de fer à des cellules endothéliales rendait ces cellules beaucoup plus sensibles au stress oxydatif (Balla *et al.*, 1990). De manière intéressante, il a été démontré que l'inflammation réduisait significativement l'excrétion du fer en diminuant l'expression de la ferroportine des phagocytes (Fillet, Cook et Finch, 1974; Kondo *et al.*, 1988; Delaby *et al.*, 2005). Ainsi, ce phénomène pourrait renforcer l'accumulation intracellulaire du fer chez les MP des patients atteints de maladies hémolytiques puisque ces pathologies sont associées à la production de diverses cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  (Kwiatkowski *et al.*, 1990; Kuvibidila *et al.*, 1997; McGuire *et al.*, 1998; Wanachiwanawin *et al.*, 1999; Seixas *et al.*, 2009).

A la vue des trois axes de recherche, nous concluons que les infections par *Plasmodium* modulent de manière importante le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, le développement du parasite dans le sang stimule l'activation et le recrutement des cellules TregN tout en induisant l'ingestion de quantités importantes d'HZ, d'HE et d'Hb par les MP vraisemblablement responsable de l'inhibition de leur sécrétion d'IL-12 et à terme de la diminution de leur viabilité *in vivo*. Connaissant l'importance de l'IL-12 et des MP dans la réponse antiparasite et dans le développement de l'anémie (voir par. 1.1.4.2 et 1.3.1.3), il serait intéressant d'évaluer l'impact de la restauration de la sécrétion de cette cytokine ainsi que de l'amélioration de la viabilité des phagocytes sur la résolution des infections par *Plasmodium*.





**Figure 5.1: Origine et contrôle du stress oxydatif au sein des MP suite à la phagocytose de GR**

Le maintien de l'équilibre redox intracellulaire est indispensable pour le fonctionnement optimal des cellules. Des ROS capables de moduler cette balance et de créer un stress oxydatif peuvent être produits au niveau des mitochondries ou dans le cytoplasme suite à l'activation de diverses enzymes (XO, SOD, NOS et NOX) ou à la libération de fer capable de réaliser les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Afin de maintenir son équilibre redox, la cellule dispose de nombreux moyens de protection permettant de neutraliser les ROS (HO-1, GR, G6PD, TRX, GRX, GPX, catalase, Prx et SOD).

(Mito-ETC: mitochondrial electron transport chain; ER: endoplasmic reticulum; NOX: NADPH oxidase; XO: xanthine oxidase; NOS: nitric oxide synthase; TRXo/r: thioredoxin (oxidized/reduced); GRXo/r: glutaredoxin (oxidized/reduced); GSSG/GSHr: glutathione (oxidized/reduced); oxyHb: oxyhemoglobin; metHb: methemoglobin; RBC: red blood cell).

Source: (Trachootham, Alexandre et Huang, 2009)



## 5.4. Réflexions générales

### 5.4.1. Restauration de la sécrétion d'IL-12 et de la viabilité des MP lors des infections par *Plasmodium*

Nos résultats démontrent que l'ingestion d'HE entraîne un stress oxydatif ayant des répercussions sur la sécrétion d'IL-12 et sur la viabilité des MP *in vitro* (Cambos *et al.*, 2010; Cambos et Scorza, 2011). Les infections par *Plasmodium* étant associées à une érythrophagocytose importante de GR parasités ou abîmés ainsi qu'à des niveaux élevés d'Hb et d'HE libres dans le sang, les MP ingèrent des quantités importantes d'HE *in vivo*. Ainsi, il est probable que l'inhibition de la production d'IL-12 et l'apoptose des MP observées durant les infections par *Plasmodium* puissent être dues à l'induction d'un stress oxydatif par l'HE. Comme nous l'avons décrit précédemment, la sécrétion d'IL-12 et l'implication des MP dans la réponse antiparasite sont d'une importance capitale dans la résolution des infections par *Plasmodium* (voir par. 1.1.4.2). De plus, une étude a démontré que l'élimination des MP avant les infections par *Py* conduisait à un contrôle moins efficace du parasite et à une aggravation de l'anémie confirmant le rôle important de ces cellules pendant la malaria (Couper *et al.*, 2007). Ainsi, limiter l'ingestion d'HE par les MP ou tempérer le stress oxydatif associé à l'accumulation intracellulaire de cette molécule pourraient permettre de mieux contrôler le *Plasmodium* ainsi que de diminuer la pathologie associée aux infections.

Plusieurs études ont démontré que la transfusion de GR sains favorise le contrôle de l'infection par *Plasmodium* (Hejna, Rencricca et Coleman, 1974; Falanga et Pereira da Silva, 1989; Yap et Stevenson, 1994). Bien que le mécanisme par lequel la transfusion permette aux souris de résoudre l'infection n'ait pas été confirmé, l'hypothèse la plus probable est que ce traitement permettrait de limiter l'anémie, octroyant ainsi un délai supplémentaire au système immunitaire pour contrôler efficacement et éliminer le parasite. D'autre part, la transfusion diminue significativement la proportion de GR parasités/abîmés en circulation. Par conséquent, il est envisageable que les effets bénéfiques de ce traitement reposent sur le fait qu'il permette de limiter la phagocytose des GR par les MP au pic d'infection. En limitant

ainsi l'ingestion d'HE, il est possible que la viabilité des MP et leur sécrétion d'IL-12 soient améliorées permettant ainsi d'accroître leur activité antiparasitaire et de favoriser le contrôle du *Plasmodium*. Comparer l'évolution de la proportion de MP apoptotiques et la sécrétion d'IL-12 chez des souris témoins et transfusées pourrait permettre de valider cette hypothèse.

Comme décrit précédemment, les infections par *Plasmodium* sont associées au développement d'un stress oxydatif systémique s'intensifiant avec la sévérité de la maladie (Postma *et al.*, 1996). Ce stress provient principalement de l'activation de la flambée oxydative des phagocytes, de la dégradation de l'Hb dans les GR parasités et de la production de ROS catalysée par l'Hb et l'HE libre (Postma *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 2004; Ackerman, Beaudry et Fairhurst, 2009). Bien que le stress oxydatif limite le développement du parasite dans le GR et favorise son élimination (Hunt et Stocker, 1990; Becker *et al.*, 2004), il est aussi associé au développement de diverses pathologies dont l'anémie et la MC (voir art. 1.1.5). À la vue du caractère ambivalent du stress oxydatif lors des infections par *Plasmodium*, la modulation de ce dernier dans le but d'accroître la production d'IL-12 et la viabilité des MP devra être envisagée avec précaution. Des études réalisées chez la souris tendent à indiquer que la diminution systémique du stress oxydatif pourrait diminuer la pathologie et favoriser la résolution des infections par *Plasmodium*. Dans ce contexte, l'ajout de l'antioxydant hydroxyanisole butylée (BHA) dans la diète de souris A/J infectées par le *PbA* a permis de limiter considérablement le développement de la MC et a prolongé la survie des souris de 2 semaines (Thumwood *et al.*, 1989). Une autre étude utilisant des souris DBA.2 infectées par les *Pcc*, a quant à elle montré que l'ajout de l'antioxydant NAC limite la pathologie hépatique et permet aux souris de résoudre une infection normalement létale (Seixas *et al.*, 2009). Il serait intéressant de déterminer si les effets bénéfiques obtenus suite à l'utilisation de ces antioxydants sont associés à une restauration de la sécrétion d'IL-12 et/ou de la viabilité des MP. Contrairement à ces deux études utilisant des modèles murins d'infection par *Plasmodium*, l'emploi de chélateurs du fer (desferoxamine, deferiprone ou RSF) ou d'antioxydants (NAC) afin de limiter le stress oxydatif semble donner des résultats moins probants chez l'homme. Alors que certaines études rapportent que l'utilisation de ces composés en combinaison avec des médicaments anti-malaria permet de diminuer la pathologie et d'accélérer l'élimination du parasite (Gordeuk *et al.*, 1992; Gordeuk *et al.*,

1992; Lytton *et al.*, 1993; Smith et Meremikwu, 2000; Watt, Jongsakul et Ruangvirayuth, 2002; Smith et Meremikwu, 2003; Treeprasertsuk *et al.*, 2003; Ackerman, Beaudry et Fairhurst, 2009), d'autres semblent n'accorder aucun effet bénéfique à l'utilisation de ces molécules dans la résolution de l'infection (Thuma *et al.*, 1998; Smith et Meremikwu, 2003; Ackerman, Beaudry et Fairhurst, 2009; Charunwatthana *et al.*, 2009). Diriger de manière plus précise l'action des antioxydants et des chélateurs du fer vers les cellules endommagées ou rendues non fonctionnelles par le stress oxydatif, comme les MP, pourrait améliorer l'efficacité de ces traitements chez l'homme. Cette technique permettrait de diminuer la pathologie et d'améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire tout en permettant de maintenir le stress oxydatif systémique favorable à l'élimination du parasite (Ackerman, Beaudry et Fairhurst, 2009). Dans ce contexte, l'utilisation de stratégies de ciblage employant des microsphères de chitosan mannosylées ou des liposomes recouverts de polysaccharides pourraient permettre de délivrer les antioxydants et/ou les chélateurs du fer directement aux MP (Mukhopadhyay *et al.*, 1989; Sihorkar et Vyas, 2001; Jiang *et al.*, 2008).

#### **5.4.2. Immunosuppression pendant les infections par *Plasmodium* : bénéfique ou néfaste pour l'hôte?**

Que ce soit lors de la malaria ou lors d'infections causées par d'autres pathogènes où la réponse immunitaire est inhibée, l'immunosuppression est souvent considérée comme un élément néfaste permettant à l'agent infectieux d'échapper au système immunitaire. Depuis quelques années, certaines études ont démontré que l'immunosuppression peut représenter un mécanisme protecteur visant à contenir une réponse immunitaire excessive et dangereuse pour l'hôte (Belkaid et Rouse, 2005). A titre d'exemple, on pourra souligner le rôle essentiel de l'activité suppressive des cellules TregN dans le contrôle de l'homéostasie gastro-intestinale. En absence de cellules TregN, une réponse immunitaire dirigée contre les bactéries de la flore commensale provoque une importante inflammation intestinale chronique (Kullberg *et al.*, 2002). De même, la résolution des infections par *Schistosoma* dépend de la mise en place d'une réponse de type Th2 et nécessite l'activation des cellules TregN afin d'empêcher le développement d'une réponse de type Th1 associée à une pathologie inflammatoire létale (McKee et Pearce, 2004; Belkaid et Rouse, 2005). Dans le

contexte de la malaria, plusieurs études dont la nôtre (Nie *et al.*, 2007; Cambos *et al.*, 2008), ont démontré que, pendant les infections par *Plasmodium*, l'activité inhibitrice des cellules TregN permettait de limiter la pathologie conférant ainsi un rôle bénéfique à l'immunosuppression.

À la vue de ces études, la dysfonction des cellules T ainsi que l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 et l'apoptose des MP étudiées dans nos recherches, pourraient, elles aussi, représenter des mécanismes suppresseurs permettant de limiter l'inflammation et la pathologie lors des infections par *Plasmodium*. Comme décrit précédemment, l'IL-12 est capable d'induire l'expression d'IFN- $\gamma$  chez les cellules T et NK favorisant ainsi l'activation des phagocytes et leur sécrétion de TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  étant une cytokine pro-inflammatoire fortement impliquée dans le développement de la pathologie associée aux infections par *Plasmodium* (Angulo et Fresno, 2002), il est envisageable que l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 soit en réalité un mécanisme protecteur permettant de limiter la détérioration des tissus. Le caractère dangereux de fortes concentrations d'IL-12 lors des infections par *Plasmodium* tend à supporter cette hypothèse (Stevenson *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1998). De même, les MP étant la principale source de cytokines pro-inflammatoires, leur apoptose pourrait permettre de limiter l'inflammation afin de réduire les dégâts tissulaires et la pathologie.

Il est probable que la longue coexistence entre le *Plasmodium* et l'homme soit à l'origine d'une modulation de la réponse immunitaire ayant permis d'atteindre un équilibre bénéfique à la fois à l'hôte et au parasite. Ainsi, l'immunosuppression associée aux infections par *Plasmodium* permettrait de limiter la réponse immunitaire excessive et dangereuse nécessaire à l'élimination complète et rapide du parasite. Cette suppression permettrait de limiter la pathologie en autorisant un nombre restreint de parasites à persister de manière prolongée au sein de l'hôte.

## CONCLUSION

La découverte de nouveaux médicaments prophylactiques ou curatifs et l'élaboration d'un vaccin efficace contre la malaria représentent une nécessité urgente à la vue de l'émergence de parasites résistants à de nombreux traitements et des centaines de milliers de personnes succombant à cette infection chaque année. Afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'optimiser l'efficacité des vaccins dans les zones endémiques, une meilleure compréhension des interactions hôte/parasite et plus particulièrement de l'état d'immunosuppression associé aux infections par *Plasmodium* est nécessaire. Dans ce contexte, la présente étude a permis d'évaluer différents aspects de la suppression du système immunitaire associée au développement du *Plasmodium* dans le sang.

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer l'impact des cellules TregN lors des infections par *Plasmodium*. Des études antérieures avaient démontré que l'activation des cellules TregN lors des infections par *PyL* était responsable de l'induction de l'immunosuppression et du développement incontrôlé de certains parasites (Hisaeda *et al.*, 2004). Ces études ouvraient des perspectives thérapeutiques attrayantes où l'élimination des cellules TregN pourrait favoriser le contrôle et l'élimination du *Plasmodium* chez les patients atteints de la malaria. Malheureusement, notre étude est arrivée à des conclusions différentes (Cambos *et al.*, 2008). En effet, en utilisant un modèle alternatif d'infection par *Plasmodium*, nous avons déterminé que l'activation des cellules TregN pendant les infections par *Pca* avait un rôle bénéfique pour l'hôte en permettant de limiter l'inflammation et la pathologie associées à la maladie. De plus, l'activation des cellules TregN n'était pas impliquée dans la suppression des cellules T et leur élimination ne permettait pas un meilleur contrôle du parasite contrairement aux résultats rapportés précédemment. Un schéma récapitulatif de nos observations est présenté dans la figure C1. Le rôle protecteur des cellules TregN que nous avons décrit a été corroboré avec un autre modèle d'infection par *Plasmodium* où le développement de la MC était réduit grâce à l'activation de ces cellules (Nie *et al.*, 2007). Ces deux études entrent en consensus avec de nombreuses études ayant démontré que l'activation des cellules TregN lors des infections correspondait souvent à un mécanisme protecteur permettant de limiter les dégâts associés à des réponses immunitaires anti-pathogènes trop importantes (Belkaid et Rouse, 2005). En définitive, le rôle des cellules

TregN semble dépendre du modèle murin employé et il est probable que ces différences se retrouvent chez les patients atteints de la malaria. Ainsi, il sera important de déterminer les facteurs expliquant ces différences afin de pouvoir envisager la modulation de l'activation des cellules TregN comme un futur traitement anti-malaria.

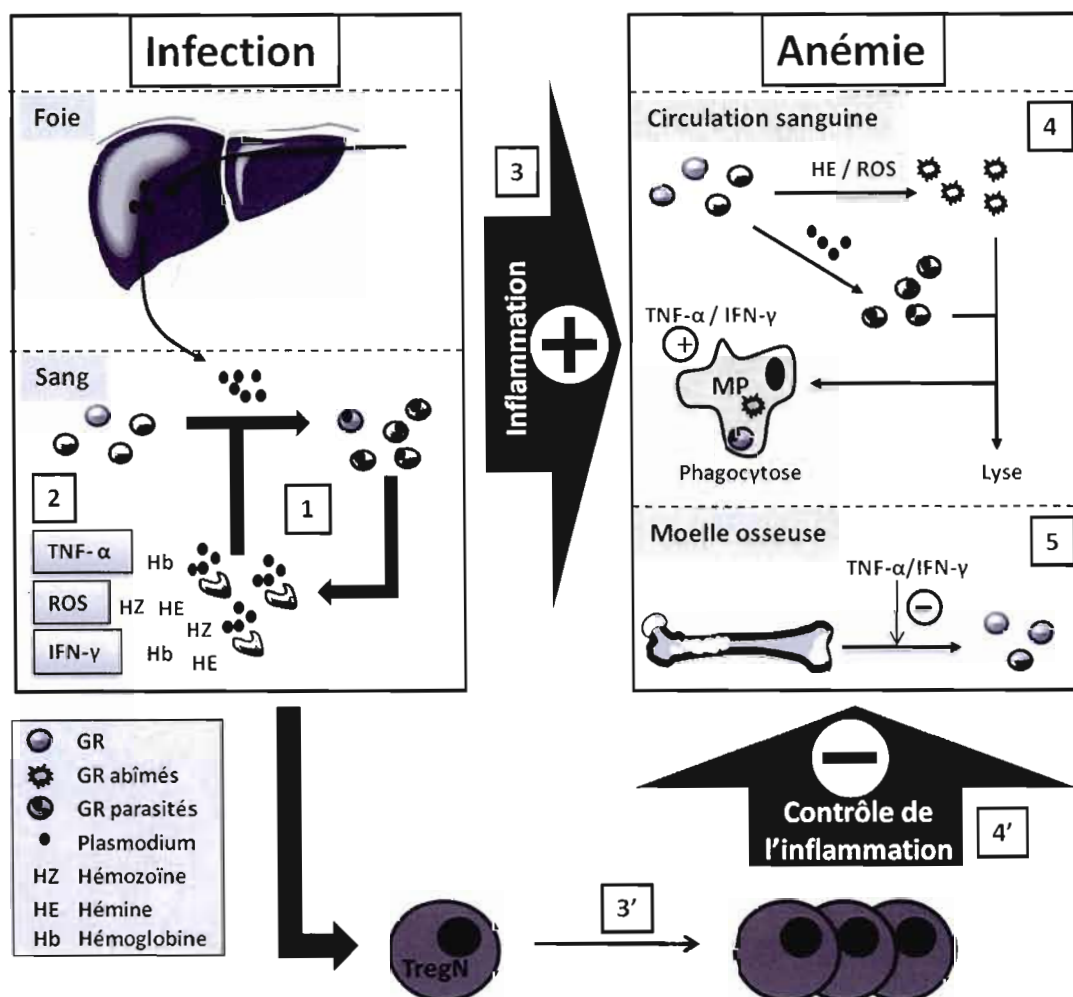
Le second objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de l'ingestion de l'HE sur la sécrétion d'IL-12 des MP. La capacité de l'IL-12 à favoriser l'érythropoïèse et son rôle prépondérant dans le contrôle du développement du parasite en font une cytokine essentielle à la résolution des infections par *Plasmodium*. Cependant, sa sécrétion par les MP semble inhibée lors des infections par *Plasmodium* et des études antérieures ont rapporté que l'accumulation de l'HZ dans les phagocytes en serait partiellement responsable (Keller *et al.*, 2006). L'internalisation importante d'HE par les MP suite à la phagocytose de GR parasités/abîmés et à l'ingestion d'Hb/HE libres contenues dans le sang nous a poussé à étudier l'impact de ce composé ferrique sur la sécrétion d'IL-12 des MP. Nous avons démontré que, tout comme l'HZ, l'HE était capable d'inhiber la sécrétion d'IL-12 des MP en réponse à une stimulation par la combinaison IFN- $\gamma$ /LPS. Contrairement à l'HZ qui semble interférer à la fois avec les voies métaboliques activées par le LPS et celles activées par l'IFN- $\gamma$ , l'HE affecte principalement l'action synergique de l'IFN- $\gamma$ . De plus, l'activité inhibitrice de l'HE sur l'IL-12 est dépendante de l'induction d'un stress oxydatif, de l'IL-10 et de la MAPK p38 alors que l'inhibition causée par l'HZ est indépendante de ces 3 facteurs. Un schéma récapitulatif de nos observations est présenté dans la figure C2. A la vue de nos résultats, il semblerait que l'inhibition de l'IL-12 rapportée lors des infections par *Plasmodium* dépende à la fois de l'accumulation d'HZ et d'HE. Le fait que les MP ingèrent à la fois de l'HE et de l'HZ lors des infections par *Plasmodium* et le fait que ces deux composés semblent inhiber la sécrétion d'IL-12 selon des mécanismes différents va complexifier la restauration de cette cytokine *in vivo*. Des études ayant démontré que de trop fortes concentrations d'IL-12 pouvaient avoir des effets néfastes sur la résolution des infections par *Plasmodium*, la restauration de l'IL-12 devra être envisagée avec attention et selon le besoin de chaque patient.

Le troisième objectif de cette étude était de comprendre comment les infections par *Plasmodium* induisaient l'apoptose des MP de la rate. Les MP de la rate phagocytant un



nombre important de GR parasités et abîmés par l'infection, l'impact de l'érythrophagocytose sur la viabilité des phagocytes a été évalué *in vitro*. En utilisant des GRDS ou des GR oxydés, nous avons pu démontrer que la phagocytose d'un nombre important de GR est capable d'induire l'apoptose des MP. La diminution de la viabilité des MP suite à une érythrophagocytose importante semble due à l'ingestion massive d'Hb et à sa dégradation en HE. Ce processus conduit à la génération d'un stress oxydatif partiellement responsable de l'apoptose. Bien que l'Hb soit essentielle au développement du stress oxydatif, il n'est pas exclu que l'activation de la NADPH oxydase contribue à l'oxydation des MP. Un schéma récapitulatif de nos observations est présenté dans la figure C3. En conclusion, il semblerait que l'ingestion répétée de GR lors des infections par *Plasmodium* conduise à une intoxication des MP et au développement de l'apoptose. Les MP étant des cellules clefs dans la réponse anti-*Plasmodium*, l'apoptose de ces cellules pourrait avoir des répercussions importantes sur le contrôle du parasite. Diverses maladies hémolytiques provoquent un vieillissement prématuré des GR et une érythrophagocytose importante. Ainsi, il est envisageable que ces pathologies soient elles aussi associées à une diminution de la viabilité des MP de la rate. Ce phénomène pourrait expliquer la susceptibilité accrue aux infections par divers pathogènes rapportée chez les personnes atteintes de maladies hémolytiques.

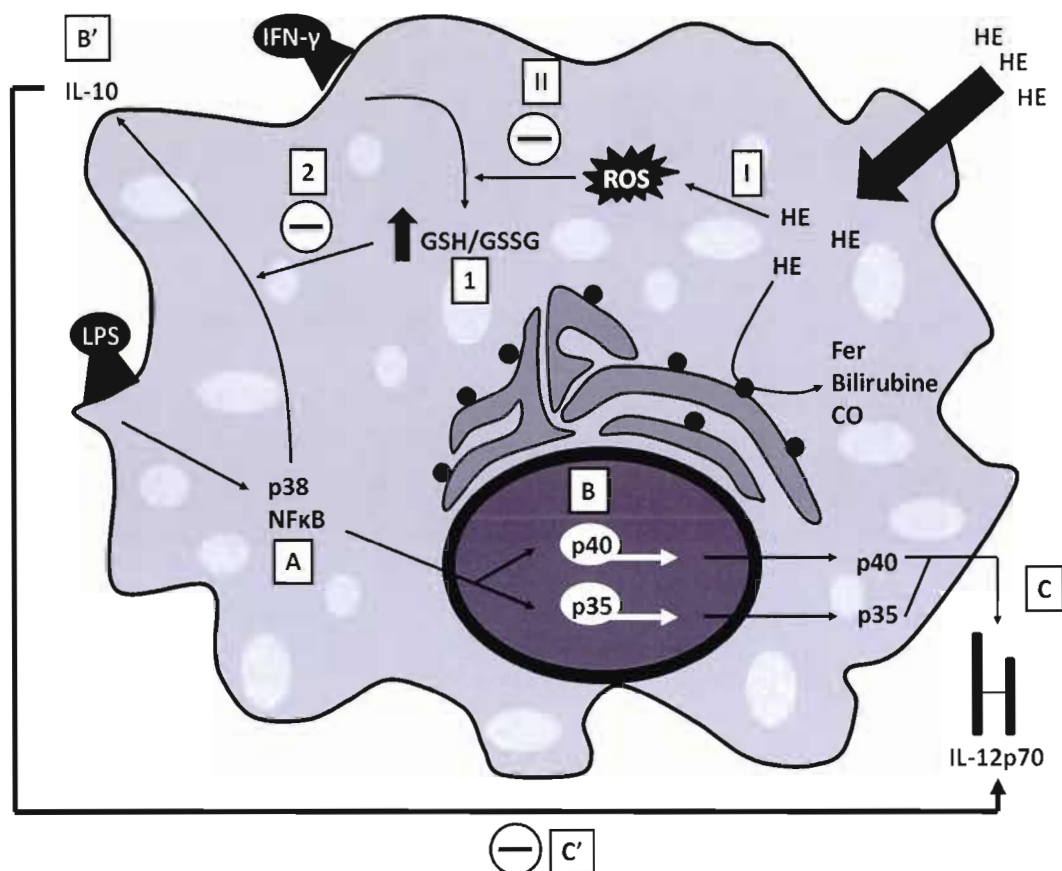
Notre étude a permis de mieux comprendre trois mécanismes modulant l'intensité de la réponse immunitaire contre le *Plasmodium*. Du fait que la réponse anti-*Plasmodium* soit responsable à la fois du contrôle du parasite mais aussi du développement de diverses pathologies, une exacerbation de cette dernière pourrait permettre une élimination plus rapide du parasite mais aussi mettre en danger la survie de l'hôte en exacerbant la pathologie. Ainsi, avant d'envisager la restauration de la sécrétion de l'IL-12 ou de la viabilité des MP ou encore l'élimination des cellules TregN, il sera important de comprendre en détail l'implication de ces facteurs dans le contrôle du parasite mais aussi dans le développement de la pathologie. De manière intéressante, notre étude a démontré que l'ingestion d'HE par les MP semble impliquée à la fois dans la suppression de la sécrétion d'IL-12 et dans la diminution de la viabilité des MP. Notre étude identifie, pour la première fois, l'HE comme une molécule pouvant moduler de manière importante le développement des infections par *Plasmodium*.



**Figure C1 : Les cellules TregN activées lors des infections par *Pca* permettent de contrôler l'inflammation et de limiter l'anémie**

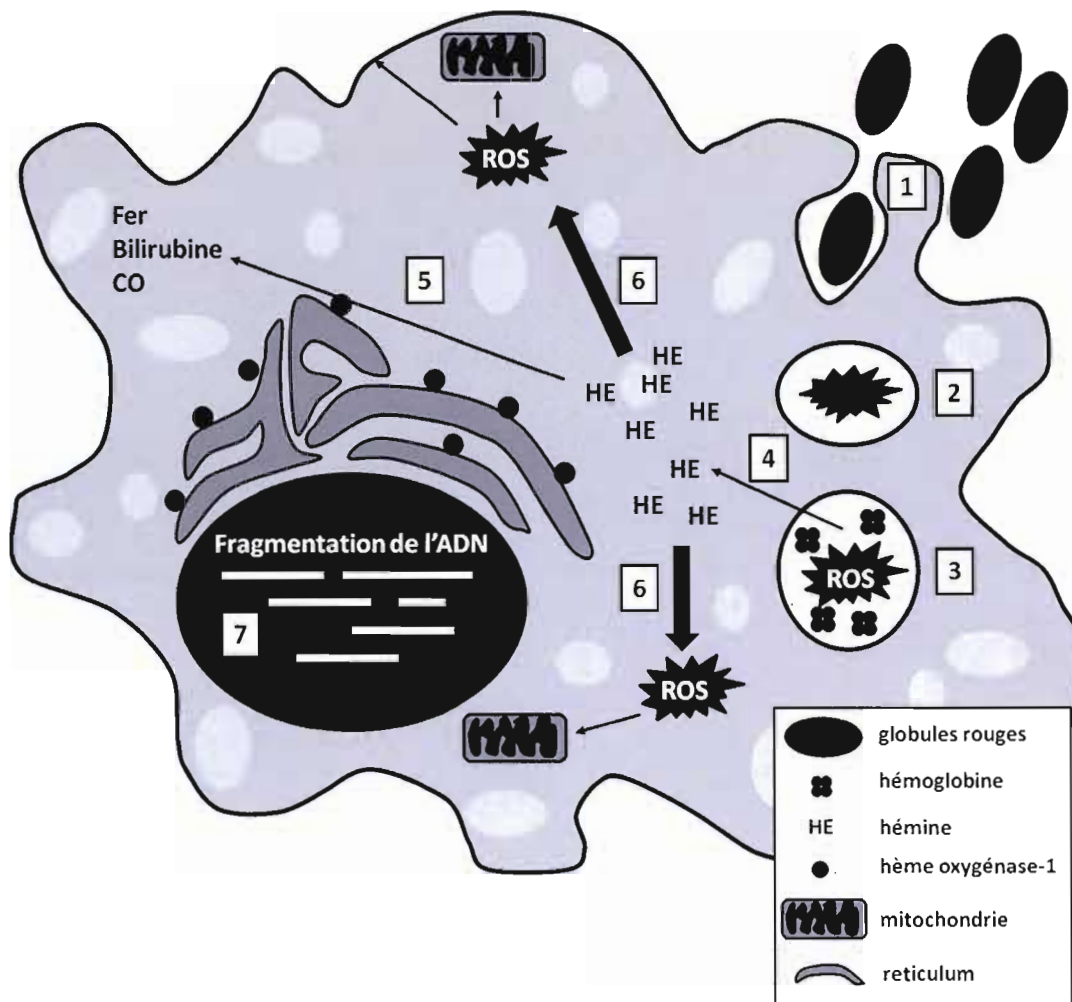
Après avoir infecté les cellules hépatiques, le *Plasmodium* rejoint la circulation sanguine pour se multiplier dans les GR (1). Suite à la lyse des GR parasités, la libération du *Plasmodium*, de l'Hb, de l'HE et de l'HZ dans le sang induit l'activation du système immunitaire déclenchant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (dont le  $TNF-\alpha$  et l' $IFN-\gamma$ ) et de ROS (2). L'inflammation et le stress oxydatif vont participer au développement de l'anémie (3) en favorisant la lyse et la phagocytose de GR sains/parasités (4) ainsi qu'en inhibant l'érythropoïèse au niveau de la moelle osseuse (5). En parallèle, les infections par *Pca* vont induire le recrutement et l'activation des cellules TregN (3') qui vont permettre de contrôler l'inflammation et ralentir le développement de l'anémie (4').





**Figure C2 : Inhibition de la sécrétion d'IL-12 des MP par l'HE**

La fixation du LPS sur son récepteur conduit à l'activation de la MAPK p38 (p38) et du NFκB (A) qui vont induire l'expression des gènes *IL-12p35* (p35) et *IL-12p40* (p40) (B) et permettre la production d'IL-12p70 (C). En parallèle, l'activation de la MAPK p38 induit aussi la production d'IL-10 (B') qui va réduire la sécrétion d'IL-12p70 (C'). La présence d'IFN-γ permet d'augmenter le ratio GSH/GSSG (1) limitant ainsi la sécrétion d'IL-10 induite par la MAPK p38 (2) et permettant du même coup d'accroître la sécrétion d'IL-12p70 (effet synergique). Suite à son internalisation par les MP, l'HE induit un stress oxydatif (I) qui va inhiber l'effet synergique de l'IFN-γ (II). Ainsi, en présence d'HE, la sécrétion d'IL-10 induite suite à la reconnaissance du LPS est maintenue (B') et la sécrétion d'IL-12p70 est inhibée (C'). Suite à son internalisation, une partie de l'HE est dégradée en fer, CO et bilirubine par la HO-1 (points noirs).



**Figure C3 : Induction de l'apoptose des MP suite à la phagocytose de GR lors des infections par *Plasmodium***

Le développement du *Plasmodium* dans le sang induit un vieillissement prématuré des GR parasités et non parasités conduisant à leur élimination par les MP. De ce fait, les MP phagocytent un nombre important de GR pendant les infections par *Plasmodium* (1). Suite à leur phagocytose, les GR sont lysés et l'Hb libérée (2). Suite à l'oxydation de l'Hb dans les phagolysosomes (3), l'HE est libérée et exportée dans le cytoplasme du phagocyte (4). Afin de neutraliser sa toxicité, l'HE est dégradé en fer, CO et bilirubine par la HO-1 (5). L'érythrophagocytose importante associée aux infections par *Plasmodium* entraînerait une accumulation intracellulaire d'HE dépassant les capacités de détoxification de la HO-1, ce qui conduirait à l'induction d'un stress oxydatif (6). Ce stress oxydatif pourrait déstabiliser la membrane des mitochondries et induire la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire et serait partiellement responsable de l'induction de l'apoptose des MP (7).

**APPENDICE A**

**PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

## **Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders**

Cambos M, Scorza T.

Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Article publié dans Journal of Leukocyte biology, september 2010.

### **Abstract**

MP from the RES are responsible for the clearance of senescent RBC. Although the frequency of senescent RBC is low under steady-state conditions, it increases dramatically during hemolytic disorders, resulting in enhanced erythrophagocytosis. As erythrophagocytosis has been involved in MP dysfunction and as certain hemolytic disorders associate to MP apoptosis, a possible link between erythrophagocytosis and the viability of phagocytes was investigated herein. To mimic hemolytic disorders, two distinct *in vitro* models, artificially oxidized RBC and DSRBC, were chosen to study the erythrophagocytosis impact on the viability of J774A.1 MP. Although CRBC were weakly phagocytosed and did not affect MP viability significantly, erythrophagocytosis of oxidized RBC and DSRBC was robust and resulted in a sharp decrease of MP viability via apoptosis. Under these conditions, Hb-derived HE was shown to be involved in the induction of apoptosis. Moreover, oxidized RBC, DSRBC, and HE generated ROS species, which were responsible for the apoptosis of MP. Furthermore, HO-1, strongly induced in response to treatment with oxidized RBC, DSRBC, or HE, was shown to protect MP partially against apoptosis, suggesting that robust erythrophagocytosis may exceed the detoxification capabilities of MP. Taken together, these results suggest that enhanced erythrophagocytosis associated to hemolytic disorders leads to MP apoptosis *in vitro* and may have critical implications for the control of malaria infection and for the exacerbated susceptibility to bacterial infections during hemolytic disorders.

## Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*

Beech R, Levitt N, Cambos M, Zhou S, Forrester SG.

Institute of Parasitology, Macdonald College, McGill University, 21,111 Lakeshore Road, Ste Anne de Bellevue, Quebec, H9X 3V9, Canada. robin.beech@mcgill.ca.

Article publié dans Molecular and Biochemical Parasitology, june 2010 (171(2):74-80).

### Abstract

Resistance to macrocyclic lactones in the strongylid parasite of sheep, *Haemonchus contortus*, is associated with specific alleles of several genes, including those encoding ligand-gated chloride-channels. While previous functional studies of the ion-channels encoded by these resistant alleles have revealed alterations in ligand binding and response to the antihelmintics, we still do not know how these alleles are contributing to resistance *in vivo*. To understand the phenomenon of anthelmintic resistance in detail we need to link changes in the genes of individual parasites with their ability to resist the effects of anthelmintic exposure. We have determined the genotype of individual adult and larval *H. contortus* with respect to the *glc-5* and *lgc-37* genes linked with macrocyclic lactone resistance. In these same individuals, we measured feeding and movement, two characteristics targeted by the drug, which are believed to contribute to parasite killing. Both genes are linked with altered behavior in the absence of drug, providing evidence that genetic resistance may be associated with alterations in parasite biology. In the presence of macrocyclic lactones, both genes are associated with a degree of protection against drug action. Whether this protection may be effective under the application of antihelmintic as part of normal farm practice and whether this could explain the evolution of resistance remain unclear.

## **The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages**

Cambos M, Bazinet S, Abed E, Sanchez-Dardon J, Bernard C, Moreau R, Olivier M, Scorza T.

Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Article publié dans *International Journal for Parasitology*, august 2010 (40(9):1003-12).

### **Abstract**

The outcome of malarial anemia is determined by a complex interplay between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines; its severity associated with accumulation of hemozoin (Hz) in macrophages, elevated IL-10 responses and impaired IL-12 production. Although free heme contributes to malarial anemia by inducing oxidative damage of red blood cells (RBCs) and enhancing their clearance by phagocytes, its impact on IL-12/IL-10 interactions has not been fully characterized. Herein, the effect of hemin (HE) on IL-12 and IL-10 responses was studied in murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) and compared with synthetic Hz. Our data reveal that HE induces modest inhibition of IL-12p70 responses to lipopolysaccharide (LPS) whereas Hz significantly impairs IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS through down-regulation of IL-12p35 and p40 gene expression. Although reactive oxygen species (ROS) are generated after short-term exposure to HE and Hz, prolonged exposure to these iron protoporphyrins has opposite effects on the cellular redox status, HE being the only compound able to promote persistent ROS production. Accordingly, the inhibitory effect of HE on IL-12p70 seems sustained by redox-dependent induction of IL-10 and is partially controlled by the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Indeed, treatment with n-acetyl-cysteine (NAC) or with the p38 MAPK inhibitor SB203580 inhibits IL-10 responses and significantly restores IL-12p70 responses to IFN $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM. Our results suggest that oxidant stress induced by free heme may potentially contribute to sustained production of IL-10 and down-regulation of IL-12 responses in malaria.

## Vaccination with a *Plasmodium chabaudi adami* multivalent DNA vaccine cross-protects A/J mice against challenge with *P. c. adami* DK and virulent *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS parasites

Scorza T, Grubb K, Cambos M, Santamaria C, Tshikudi Malu D, Spithill TW.

Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Article publié dans International Journal for Parasitology, june 2008 (38(7):819-27).

### Abstract

A current goal of malaria vaccine research is the development of vaccines that will cross-protect against multiple strains of malaria. In the present study, the breadth of cross-reactivity induced by a 30K multivalent DNA vaccine has been evaluated in susceptible A/J mice (H-2a) against infection with the *Plasmodium chabaudi adami* DK strain and a virulent parasite subspecies, *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. Immunized A/J mice were significantly protected against infection with both *P. c. adami* DK (31-40% reduction in cumulative parasitemia) and *P. c. chabaudi* AS parasites, where a 30-39% reduction in cumulative parasitemia as well as enhanced survival was observed. The 30K vaccine-induced specific IFN-gamma production by splenocytes in response to native antigens from both *P. c. chabaudi* AS and *P. c. adami* DK. Specific antibodies reacting with surface antigens expressed on *P. c. adami* DS and *P. c. chabaudi* AS infected red blood cells, and with opsonizing properties, were detected. These results suggest that multivalent vaccines encoding conserved antigens can feasibly induce immune cross-reactivity that span *Plasmodium* strains and subspecies and can protect hosts of distinct major histocompatibility complex haplotypes.

# **Natural regulatory (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi adami* infection and do not contribute to immune evasion**

Cambos M, Bélanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T.

Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Article publié dans International Journal for Parasitology, february 2008 (38(2):229-38).

## **Abstract**

Different functions have been attributed to natural regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Treg) cells during malaria infection. Herein, we assessed the role for Treg cells during infections with lethal (DS) and non-lethal (DK) *Plasmodium chabaudi adami* parasites, comparing the levels of parasitemia, inflammation and anaemia. Independent of parasite virulence, the population of splenic Treg cells expanded during infection, and the absolute numbers of activated CD69<sup>+</sup> Treg cells were higher in DS-infected mice. *In vivo* depletion of CD25<sup>+</sup> T cells, which eliminated 80% of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and 60-70% of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells, significantly decreased the number of CD69<sup>+</sup> Treg cells in mice with lethal malaria. As a result, higher parasite burden and morbidity were measured in the latter, whereas the kinetics of infection with non-lethal parasites remained unaffected. In the absence of Treg cells, parasite-specific IFN-gamma responses by CD4<sup>+</sup> T cells increased significantly, both in mice with lethal and non-lethal infections, whereas IL-2 production was only stimulated in mice with non-lethal malaria. Following the depletion of CD25<sup>+</sup> T cells, the production of IL-10 by CD90<sup>+</sup> cells was also enhanced in infected mice. Interestingly, a potent induction of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> and CD90<sup>+</sup> lymphocytes was measured in DS-infected mice, which also suffered severe anaemia earlier than non-depleted infected controls. Taken together, our data suggest that the expansion and activation of natural Treg cells represent a counter-regulatory response to the overwhelming inflammation associated with lethal *P.c. adami*. This response to infection involves Th1 lymphocytes as well as cells from the innate immune system.



## **APPENDICE B**

### **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

## Hemoglobin uptake following red blood cell phagocytosis during *Plasmodium chabaudi adami* DS infection triggers macrophage apoptosis in a ROS dependent manner

M. Cambos<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup>, A. Jardim<sup>2</sup> and T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 9<sup>ème</sup> symposium annuel de parasitologie moléculaire du Québec, Montréal (Canada), 18-19 juin 2009 (présentation orale).

### Abstract

Macrophages (MP) play a crucial role in eliminating parasitized red blood cells (RBC) and initiating specific immune response against *Plasmodium* parasites during blood stage malaria. While fighting the infection, MP phagocytose numerous parasitized as well as damaged RBC and accumulate the malaria pigment Hemozoin (HZ). This phagocytosis could be responsible for MP apoptosis measured during *Plasmodium* infections.

Herein, we evaluated the ability of RBC recovered from naïve (NRBC) or *P. c. adami* DS infected BALB/c mice (DSRBC) as well as synthetic HZ to induce apoptosis in Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) and in J774 monocyte/macrophage cells. Our results indicate that BMDM and J774 ingest important amounts of DSRBC and HZ but few NRBC. Whereas incubation with NRBC or uptake of HZ did not affect MP viability, phagocytosis of DSRBC induces significant MP apoptosis in a dose dependent manner. MP apoptosis seemed consequent to oxidative stress as uptake of DSRBC induces reactive oxygen species (ROS) and treatment with antioxidants (NAC and GSH) partially corrected it. Oxidation of NRBC with CuSO<sub>4</sub> and L-ascorbate significantly enhanced their phagocytosis and induced MP apoptosis, suggesting that cell death can be induced by RBC specific components. Moreover, treatment of J774 with increasing concentrations of Hemoglobin (Hb) induced MP apoptosis, whereas uptake of DSRBC Ghosts (Hb free) did not affect phagocyte viability.

In conclusion, ingestion of Hb following DSRBC phagocytosis is responsible for MP apoptosis during *Plasmodium* infection through a ROS dependent mechanism.

## Hemozoin and Hemin modulate IL-12 responses through distinct mechanisms in bone marrow derived macrophages

S. Bazinet<sup>1</sup>, M. Cambos<sup>1</sup>, J. Sanchez Dardon<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup> and T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 9<sup>ème</sup> symposium annuel de parasitologie moléculaire du Québec, Montréal (Canada), 18-19 juin 2009 (présentation poster).

### Abstract

Hemozoin (HZ), issued from the conversion of heme in protoporphyrin IX crystals and protecting *Plasmodium* parasites against free heme toxicity, modulates the inflammatory function in macrophages by oxidative stress dependent and independent mechanisms. We compared the oxidant properties of HZ and hemin (HE) as well as their capacity to modulate IL-12 (p40 and p70) and IL-10 responses in bone marrow derived macrophages (BMDM). Our data suggests that in respect to HE, HZ is weak inducer of reactive oxygen species (ROS) and interestingly, drastically decreases ROS, and increases total glutathione and intracellular GSH/GSSG ratio once accumulated for 16-18 hours. Albeit sharing with HE moderate inhibitory effects on IL-12p40 production, HZ inhibits in a more pronounced manner the IL-12p70 response to LPS and IFN- $\gamma$ /LPS, hampering also IL-10 secretion. Treatment with N-acetyl-cysteine (NAC) or neutralization of IL-10 significantly corrects the inhibition induced by HE, without modifying the detrimental effects of HZ. P38 MAPK inhibition blocks IL-10 responses and significantly restores IL-12p70 responses to IFN- $\gamma$ /LPS in HE-conditioned BMDM, failing to modify the effect of HZ. In conclusion, our data suggests that in contrast to HE, HZ inhibits IL-12p70 through a mechanism independent of oxidative stress or IL-10 induction through the p38 MAPK pathway.

## **Hemoglobin uptake following red blood cell phagocytosis during *Plasmodium chabaudi adami* DS infection triggers macrophage apoptosis in a ROS dependent manner**

M. Cambos<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup>, A. Jardim<sup>2</sup> and T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 5<sup>ème</sup> colloque annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 30 avril 2009 (présentation orale).

Macrophages (MP) play a crucial role in eliminating parasitized red blood cells (PRBC) and initiating specific immune response against *Plasmodia* during the blood phase of malaria. Interestingly, *Plasmodium* infections have been reported to trigger massive MP apoptosis in spleen.

While fighting the infection, MP phagocytose numerous PRBC and damaged RBC (DRBC) and accumulate the malaria pigment Hemozoin (HZ). This phagocytosis could be responsible for MP apoptosis during Malaria.

Here, we evaluated RBC recovered from naïve or *Plasmodium chabaudi adami* DS infected mice as well as synthetic HZ for their ability to induce apoptosis on Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) and on the monocyte/macrophage cell line J774. Our results show that BMDM and J774 phagocytose large amount of RBC from infected mice and HZ but few RBC from naïve mice. While incubation with NRBC or phagocytose of HZ did not affect significantly MP viability, phagocytosis of PRBC induces MP apoptosis in a dose dependent manner. Apoptosis seems to be induced via an oxidative stress as PRBC phagocytosis triggers reactive oxygen species (ROS) production and MP apoptosis is partially corrected by antioxidants such as N-Acetyl-Cystein (NAC) or reduced glutathion (GSH). An oxidative treatment, mimicking damages inflicted on RBC during *Plasmodium* infections and triggering NRBC phagocytosis by MP, allowed us to induce significant apoptosis in MP suggesting that cell death could be induce by a component specific to RBC. Treatment of J774 with increasing concentration of hemoglobin (Hb), the major component of RBC, induced MP apoptosis. To ascertain that Hb was really responsible for the induction of

apoptosis by PRBC, we showed that PRBC Ghost (deprived of their Hb) were not able to induce MP apoptosis anymore although they were phagocytosed.

To conclude, phagocytosis of PRBC and possibly damaged/oxidized RBC could be responsible for MP apoptosis during infection. Apoptosis seems to originate from Hb uptake and ROS production possibly via cytoplasmic heme accumulation.

## **L'hémozoïne et l'hémine modulent la production d'IL-12 par des mécanismes différents chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse**

S. Bazinet<sup>1</sup>, M. Cambos<sup>1</sup>, J. Sanchez Dardon<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup> & T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 5<sup>ème</sup> colloque annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 30 Avril 2009 (présentation poster).

### **Abstract**

L' hémozoïne (HZ), formée par conversion de l'hème en cristaux de protoporphyrine IX afin de protéger le parasite *Plasmodium* de la toxicité de l'hème libre, module la fonction inflammatoire des macrophages par des mécanismes dépendants et indépendants du stress oxydatif. Nous avons comparé les propriétés oxydantes de l'HZ et de l'hémine (HE) et leur capacité de moduler la production d'IL-12 (p40 et p70) et d'IL-10 chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse (MMO). Nos données suggèrent que par rapport à l'HE, l'HZ n'est pas une bonne inductrice des espèces réactives de l'oxygène. Malgré le fait qu'elle partage avec l'HE des effets inhibiteurs modérés sur la production d'IL-12p40, l'HZ inhibe de façon plus prononcée la sécrétion d'IL-12p70 ainsi que la production d'IL-10 en réponse à la stimulation IFN- $\gamma$ /LPS. Le traitement avec N-acétyl-cystéine (NAC) ou la neutralisation d'IL-10 ont corrigé partiellement l'inhibition d'IL-12p70 par l'HE, sans modifier les effets de l'HZ. L'inhibition de la MAP kinase p38 a bloqué la production d'IL-10 et restauré de façon significative la production d'IL-12p70 chez les MMO conditionnés avec l'HE, sans néanmoins corriger la suppression par l'HZ. En conclusion, nos données suggèrent que contrairement à l'HE, l'HZ inhibe la production d'IL-12p70 par un mécanisme indépendant du stress oxydatif et de l'induction d'IL-10 par la voie de la MAPK p38.

## Neutralization of MIF upregulates TNF- $\alpha$ and changes the time course of IFN- $\gamma$ responses during *Plasmodium c. adami* infection

B. Belanger<sup>1</sup>, M. Cambos<sup>1</sup>, S. Bazinet<sup>1</sup>, L. Leng<sup>2</sup>, R. Bucala<sup>2</sup> and T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>Yale University School of Medicine.

Résumé au 8<sup>ème</sup> symposium annuel de parasitologie moléculaire du Québec, Montréal (Canada), 12 et 13 juin 2008 (présentation poster).

### Abstract

Malaria is an inflammatory disease characterized by a potent production of TNF- $\alpha$ , MIF and IFN- $\gamma$ , cytokines that inhibit erythropoiesis in the bone marrow. In this context, the macrophage migration inhibitory factor (MIF) is readily secreted during *Plasmodium* infection, and synergizes with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  to inhibit erythroid differentiation and haemoglobin production. In our laboratory, *in vivo* neutralization of MIF during *P. c. adami* infection led to a significant and reproducible decrease in peak parasitemia and to the up-regulation of TNF- $\alpha$  production at early and peak infection. Treatment with anti-MIF mAb antibody had contrasting effects on IFN- $\gamma$  and IL-10 during the time course of infection. At the time of low parasitemia, a significant decrease in IFN- $\gamma$  production, accompanied by an important drop in IL-10 was measured in the spleen of MIF-neutralized infected mice. In contrast, at peak parasitemia, IFN- $\gamma$  and IL-10 responses were significantly increased by the treatment. Besides the inhibitory effects on peak parasitemia, MIF neutralization led to a significant drop in the percentage of circulating reticulocytes at early infection, and this effect was accompanied by a mild decrease in Ery A (TER<sup>high</sup>CD71<sup>high</sup>FSC<sup>high</sup>) precursors in the spleen but not in the bone marrow and decreased anaemia. Our results suggest that neutralization of MIF reduces the inflammatory response at early infection, and contributes to the control of parasitemia and anaemia.

## The phagocytosis of parasitized red blood cells induces the apoptosis of macrophages during *Plasmodium chabaudi adami* infections

M. Cambos<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup>, A. Jardim<sup>2</sup> and T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 8<sup>ème</sup> symposium annuel de parasitologie moléculaire du Québec, Montréal (Canada), 12 et 13 juin 2008 (présentation poster).

### Abstract

The phagocytosis of complement-opsonized targets is a primary function at inflammation sites, and macrophages, in contrast to neutrophils, can repeat the phagocytic cycle and oxidative burst without entering apoptosis. Interestingly, *Plasmodium* infections are characterized by a significant increase in the percentages of apoptotic macrophages (M $\phi$ ) which are cells that avidly ingest infected red blood cells (iRBC) and accumulate hemozoin (HZ) the malaria pigment in their cytoplasm. The effect of naïve and parasitized red blood cells (PRBC) as well as of synthetic  $\beta$ -hematin on the apoptotic state of murine bone marrow derived M $\phi$  (BMM $\phi$ ) and J774 cells were studied. Our results indicate that phagocytosis of PRBC but not synthetic HZ or naïve RBC triggered the apoptosis of J774 cells and BMM $\phi$ . The effect was shown to be dose dependent and became evident at ratios as low as 25 PRBC per M $\phi$ . In addition to their pro-apoptotic capacity, the phagocytosis of PRBC induced the secretion of soluble immunosuppressive factors inhibiting the proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell in response to stimulation with Concanavalin A. We are currently investigating the nature of the signaling events triggering macrophage apoptosis as well as the possible relationship between programmed cell death and the release of immunosuppressive factors.



## Rôle du facteur d'inhibition de migration des macrophages, dans le contrôle de la réponse pro-inflammatoire durant une infection par *Plasmodium chabaudi adami*

B. Belanger<sup>1</sup>, M. Cambos<sup>1</sup>, S. Bazinet<sup>1</sup>, L. Leng<sup>2</sup>, R. Bucala<sup>2</sup> and T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>Yale University School of Medicine.

Résumé au 4<sup>ème</sup> congrès annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 30 Avril 2008 (présentation poster).

### Abstract

L'anémie induite durant l'infection par le parasite protozoaire *Plasmodium* résulte en partie de l'inhibition de la production des précurseurs érythropoïétiques dans la moelle osseuse par l'action de cytokines pro-inflammatoires. Le facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF) est sécrété durant l'infection par *Plasmodium*, et entre en synergie avec l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  afin d'inhiber l'érythropoïèse et la production d'hémoglobine. Dans notre laboratoire, une neutralisation *in vivo* de MIF pendant une infection par *Plasmodium c. adami* amène à une réduction significative du pourcentage de réticulocyte circulant avant le pic d'infection, cependant une production similaire d'hémoglobine est observée chez les souris neutralisées ou témoins. L'anti-MIF entraîne une augmentation de la production IL-10 par les cellules spléniques, tout comme une production accrue de TNF- $\alpha$  et augmentation de la production IFN- $\gamma$  par les cellules non-T (CD90<sup>-</sup>). L'élimination des cellules NK CD49<sup>+</sup> diminue significativement le niveau d'IFN- $\gamma$  dans la population de cellules spléniques CD90<sup>-</sup> traitées avec l'anti-MIF et infectées avec *Plasmodium*. Ces observations suggèrent que le MIF a un rôle comparable à celui dans la régulation des cellules NK dans le placenta. Pris ensemble, nos résultats tendent à démontrer un rôle important du MIF dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte durant une infection par *Plasmodium*. Des expériences en cours vont permettre l'analyse de l'effet du MIF sur précurseurs érythropoïétiques, dans la moelle osseuse et dans la rate, durant une infection par *Plasmodium c. adami*.

## La phagocytose de globules rouges parasités provoque l'apoptose des macrophages pendant les infections par *Plasmodium chabaudi adami*

M. Cambos<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup>, A. Jardim<sup>2</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 4<sup>ème</sup> congrès annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 30 Avril 2008 (présentation poster).

### Abstract

La phagocytose de pathogènes opsonisés par le complément et/ou les anticorps a une importance capitale lors des réponses immunitaires innée et adaptative. Contrairement aux neutrophiles, les macrophages (M $\phi$ ) sont capables de répéter plusieurs cycles de phagocytose et de flambée oxydative sans entrer en apoptose. De manière intéressante, les infections par *Plasmodium* sont caractérisées par une augmentation significative du pourcentage de M $\phi$  apoptotiques. Pendant l'infection, les M $\phi$  ingèrent une grande quantité de globules rouges parasités (GRP) et accumulent ainsi dans leur cytoplasme le pigment malarique nommé hémozoïne (HZ). Ce phénomène pourrait être en relation directe avec l'induction de l'apoptose chez les M $\phi$ .

Pour tester cette hypothèse, le caractère pro-apoptotique de globules rouges sains (GRS), de GRP ainsi que celui de l'HZ synthétique a été évalué *in vitro* sur des M $\phi$  dérivés de la moelle osseuse (M $\phi$ DM) et sur la lignée de M $\phi$  J774.

Nos résultats indiquent que la phagocytose de GRP, mais pas de l'HZ ou de GRS, déclenche l'apoptose des M $\phi$ DM et des cellules J774. Cet effet est dose dépendant et devient observable à partir d'un ratio aussi bas que 25 GRP par M $\phi$ . En plus de leur capacité pro-apoptotique, les GRP induisent chez les M $\phi$  la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs solubles inhibant la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> stimulées avec la Concanavaline A.

Nos travaux futurs porteront sur l'identification des voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'apoptose ainsi que la possible relation entre cette dernière et la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs.

## The phagocytosis of parasitized red blood cells induces the apoptosis of macrophages during *Plasmodium chabaudi adami* infections

M. Cambos<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup>, A. Jardim<sup>2</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 21<sup>ème</sup> annual CSI conference, Mont Tremblant (Canada), 11-14 Avril 2008 (présentation poster).

### Abstract

The phagocytosis of complement-opsonized targets is a primary function at inflammation sites, and macrophages, in contrast to neutrophils, can repeat the phagocytic cycle and oxidative burst without entering apoptosis. Interestingly, *Plasmodium* infections are characterized by a significant increase in the percentages of apoptotic macrophages (M $\phi$ ) which are cells that avidly ingest infected red blood cells (iRBC) and accumulate hemozoin (HZ) the malaria pigment in their cytoplasm. The effect of naïve and parasitized red blood cells (PRBC) as well as of synthetic  $\beta$ -hematin on the apoptotic state of murine bone marrow derived M $\phi$  (BMM $\phi$ ) and J774 cells were studied. Our results indicate that phagocytosis of PRBC but not synthetic HZ or naïve RBC triggered the apoptosis of J774 cells and BMM $\phi$ . The effect was shown to be dose dependent and became evident at ratios as low as 25 PRBC per M $\phi$ . In addition to their pro-apoptotic capacity, the phagocytosis of PRBC induced the secretion of soluble immunosuppressive factors inhibiting the proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell in response to stimulation with Concanavalin A. We are currently investigating the nature of the signaling events triggering macrophage apoptosis as well as the possible relationship between programmed cell death and the release of immunosuppressive factors.

**Rôle du facteur d'inhibition de la migration des  
macrophages (MIF) et des cellules Natural Killers (NK)  
dans l'anémie hémolytique associée à l'infection non  
virulente de *Plasmodium chabaudi adami***

B. Bélanger<sup>1</sup>, M. Cambos<sup>1</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal.

Résumé au 21<sup>ème</sup> annual CSI conference, Mont Tremblant (Canada), 11-14 Avril 2008 (présentation poster).

**Abstract**

L'anémie hémolytique provoquée durant l'infection par *Plasmodium* résulte en partie de l'inhibition de précurseurs érythropoïétiques dans la moelle osseuse par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF) est une cytokine ayant la capacité de stimuler la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les cellules immunitaires. De plus, le MIF est sécrété en grande quantité durant l'infection. De façon surprenante, la neutralisation *in vivo* de MIF durant l'infection par *P. c. adami* DK a provoqué une diminution du pourcentage de réticulocytes en circulation. L'analyse des cytokines sécrétées par les cellules spléniques des souris neutralisées et infectées a indiqué une forte augmentation des niveaux d'IL-10 ainsi qu'une augmentation radicale de la sécrétion *ex vivo* d'IFN- $\gamma$ , laquelle persistait dans des cultures cellulaires exemptes des cellules T, ce qui nous porte à croire que les cellules NK seraient les cellules sécrétrices. Afin de vérifier cette hypothèse, un marquage intracellulaire des cellules NK de la moelle osseuse ainsi qu'une sélection positive des cellules NK spléniques seront effectués afin de confirmer si elles sont la source de l'IFN- $\gamma$  produit. De plus, nous allons évaluer l'impact de la neutralisation de MIF sur les précurseurs érythropoïétiques dans la moelle osseuse et dans les cellules spléniques. Nous proposons que le MIF inhibe la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK durant l'infection, ce qui lui assigne un rôle dans la tolérance immunitaire comparable à celui décrit pour cette cytokine dans le placenta.

## Natural regulatory T (Treg) cells limit the inflammatory response during *P. c. adami* infections and are not involved in parasite virulence

M. Cambos<sup>1</sup>, B. Bélanger<sup>1</sup>, A. Roulet<sup>2</sup>, A. Jacques<sup>1</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 13th International congress of Immunology, Rio de Janeiro (Brésil), 21-25 août 2007  
(présentation poster).

### Abstract

Detrimental functions have been attributed to natural regulatory (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) (Treg) cells during *Plasmodium yoelii* and *P. falciparum* infections. Herein, the role of natural Treg cells in the outcome of *P. chabaudi adami* virulent (DS) and non-virulent (DK) infection was studied. *P.c. adami* DS parasites have higher replication rates and give rise to important parasite burdens, when compared to infections with *P. c. adami* DK parasites. In respect to immune parameters, comparable dysfunction and apoptosis were observed in splenic T cells from mice infected with either parasite strain, and a similar suppressive activity dependent on cell-to-cell contact was associated with purified T cell from infected and naive mice. Although an important increase in the number of splenic natural Treg cells was measured during virulent DS infection, *in vivo* depletion of CD25<sup>+</sup> T cells did not eliminate the lethality associated with this parasite strain; on the contrary, higher parasite burdens were observed in DS-infected mice deprived of Treg cells prior to infection, whereas infections with non-virulent DK parasites remained unaffected. Interestingly, significant higher production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and MIF were measured in mice with virulent *P. c. adami* DS infection, when compared to infection with non-virulent *P. c. adami* DK parasites. The profiles of pro-inflammatory cytokines were drastically exacerbated in mice depleted of natural Treg cells prior to infection, and were accompanied by drastic drop in IL-10 production, changes that were in particular more marked in mice with virulent infection. Taken together, our observations strongly suggest that the expansion of natural Treg cells during *P. c. adami* DS infection may represent a response in the face of systemic inflammation and does not represent a strategy exploited by these parasites to circumvent protective immunity.

## **Natural regulatory T cells (Tregs) limit the inflammatory response during *P. c. adami* infections and are not involved in parasite virulence**

M. Cambos<sup>1</sup>, B. Bélanger<sup>1</sup>, A. Roulet<sup>2</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé à la 46<sup>ème</sup> réunion annuelle de la Société Canadienne de Zoologie, Montréal (Canada), 21-25 mai 2007 (poster présentation).

### **Abstract**

Tregs have been involved in immune evasion by pathogens. In this respect, evidence suggests that during infections with human (*P.falciparum*) and murine (*P. yoelii*) parasites, Tregs contribute to increased parasite multiplication rate and virulence. However, as *Plasmodium* infections generate an intense inflammatory response, Treg suppressive activity could play a beneficial role in attenuating harmful inflammation. Using infections with the virulent DS and the avirulent DK *P. c. adami* strains in BALB/c mice, we show that *in vivo* depletion of Tregs, rather than annihilating parasite virulence, exacerbate the inflammatory response and slightly accelerate DS multiplication. Our results suggest that during *P. c. adami* infections Tregs help restrain inflammation hence minimizing infection side effects.

**Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages  
(MIF) : niveaux de production chez des infections virulentes  
et non-virulentes par *Plasmodium c. adami***

B. Bélanger<sup>1</sup>, M. Cambos<sup>1</sup>, M. Olivier<sup>2</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 3<sup>ème</sup> congrès annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 2 mai 2007 (présentation poster).

**Abstract**

Les infections par *Plasmodium* sont caractérisées par une forte anémie hémolytique, laquelle est partiellement conséquence à la production des cytokines pro-inflammatoires inhibitrices de l'érythropoïèse telle que le facteur de migration d'inhibition des macrophages (MIF). Le pigment malarique hémozoïne semble être impliqué dans l'anémie, en régulant la production de MIF et ses effets sur l'érythropoïèse. Dans cette étude, la production de MIF a été comparée chez des souris infectées par des souches virulentes (DS) et non virulentes (DK) de *P. c. adami*. L'effet du prétraitement *in vivo* avec de l'hémozoïne synthétique sur la cinétique d'infection avec la souche non virulente et sur la production de réticulocytes a été comparé. MIF a été induit pendant l'infection et son production était plus élevée chez des souris avec des infections virulentes. MIF a été aussi induit suite à un prétraitement *in vivo* avec de l'hémozoïne, lequel a aussi provoqué un retard dans la résolution de l'infection ainsi que dans la production de réticulocytes. En conclusion, nos résultats suggèrent que l'hémozoïne joue un rôle important dans l'induction de MIF et dans l'anémie, et semble exacerber les effets de l'inflammation sur l'érythropoïèse.

## Caractérisation de la réponse des cellules B contre un antigène T-dépendent pendant l'infection par *Plasmodium c. adami*

J.L. Cueva-Vargas, M. Cambos and T. Scorza.

Université du Québec à Montréal.

Résumé au 3<sup>ème</sup> congrès annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 2 mai 2007 (présentation poster).

### Abstract

Les infections par *Plasmodium* ont été associées à l'activation polyclonale des réponses immunes humores non-spécifiques. Néanmoins, les mécanismes par lesquels *Plasmodium* agit sur les cellules B et la production d'anticorps suite à une immunisation avec un antigène T- dépendant restent inconnus. Dans une étude préliminaire, des souris BALB/c ont été infectées avec *P. c. adami* DK avant d'être immunisées avec la  $\gamma$ -Globuline humaine. L'infection diminue de manière non statistiquement significative la réponse d'anticorps IgG, IgG1 et IgG2a spécifiques. En revanche, en infectant après l'immunisation les titres d'anticorps ont diminué drastiquement. Ces résultats montrent un effet important de l'infection du *P. c. adami* sur les réponses des cellules B à un antigène T- dépendant.



## Natural regulatory T (Treg) cells are not responsible for *Plasmodium chabaudi adami* virulence but rather down-regulate the inflammatory response during infection

M. Cambos<sup>1</sup>, B. Bélanger<sup>1</sup>, A. Roulet<sup>2</sup>, A. Jacques<sup>1</sup> et T. Scorza<sup>1</sup>.

Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 11th annual Woods Hole Immunoparasitology meeting, Woods Hole (USA), 29 avril au 2 mai 2007 (présentation orale).

### Abstract

Detrimental functions have been attributed to natural regulatory (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) (Treg) cells during *P. yoelii* and *P. falciparum* infections. Herein, the role of natural Treg cells in the outcome of *P. c. adami* virulent (DS) and non-virulent (DK) infection was studied. DS parasites have higher replication rates and give rise to higher parasite burdens, when compared to infection with DK parasites. In respect to immune parameters, comparable dysfunction and apoptosis were observed in splenic T cells from mice infected with either parasite strain, and a similar suppressive activity dependent on cell-to-cell contact was associated with purified T cell from infected and naive mice. Although an important increase in the number of splenic natural Treg cells during virulent DS infection was measured, *in vivo* depletion of CD25<sup>+</sup> cells did not eliminate the lethality associated with this parasite strain; on the contrary, this treatment led to higher parasite burdens, whereas infections with non-virulent DK parasites remained unaffected. Interestingly, significant higher production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10 and MIF were measured in mice with virulent *P. c. adami* DS infection, when compared to infection with non-virulent DK parasites. The profiles of pro-inflammatory cytokines were drastically exacerbated in mice depleted of natural Treg cells prior to infection, and were accompanied by drastic drops in IL-10 and TGF- $\beta$  production, changes that were in particular more marked in mice with virulent infection. Taken together, our observations suggest that the expansion of natural Treg cells during DS infection may represent a response in the face of systemic inflammation and is not a strategy exploited by these parasites to circumvent protective immunity.

## Cellules T régulatrices et Malaria : une étude comparative chez des souches de *Plasmodium* virulentes et non virulentes

Cambos Mathieu<sup>1</sup>, Roulet Alain<sup>2</sup>, Scorza Tatiana<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 2<sup>ème</sup> congrès annuel du Biomed (UQAM), Montréal (Canada), 27 avril 2006 (présentation orale).

### Abstract

L'activité suppressive des cellules T régulatrices naturelles (Treg) (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) a été liée à la virulence ainsi qu'à l'immunosuppression observée pendant l'infection par *Plasmodium yoelii* (souche 17XL) chez la souris. Nous avons comparé la dynamique de la population des cellules Treg spléniques au cours d'infections virulentes (*P. c.* DS, *P. yoelii* YM) et non virulente (*P. c. adami* DK, *P. yoelii* 17XNL) chez des souris BALB/c.

Nos résultats, corroborés par trois analyses complémentaires (phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>, quantification de l'expression du gène FOXP3 par PCR en temps réel et détection intracellulaire de FOXP3), démontrent une forte chute du pourcentage des cellules Treg naturelles au pic d'infection avec les deux espèces de parasite et de façon indépendante de la virulence. En parallèle, une augmentation considérable du niveau des cytokines suppressives IL-10 et TGF- $\beta$  dans la rate a été constatée.

Actuellement, nous évaluons l'impact de la déplétion *in vivo* des cellules T régulatrices naturelles sur la cinétique des infections ainsi que les propriétés immunosuppressives des cellules T spléniques purifiées à partir de souris présentant des parasitémies comparables.

Cette étude permettra d'élucider si d'autres populations de cellules T à caractère suppressif jouent un rôle prioritaire dans l'immunosuppression associée à la malaria.

## Cellules T régulatrices et malaria : une étude comparative chez des souches de *Plasmodium* virulentes et non virulentes

M. Cambos<sup>1</sup>, A. Roulet<sup>2</sup>, T. Scorza<sup>1</sup>.

Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 74ème Congrès de l'ACFAS, Ste-Anne-de-Bellevue (Canada), 17 mai 2006 (présentation orale).

### Abstract

Les cellules T régulatrices (Tregs) sont connues pour contrôler les réactions auto-immunes. En revanche, leur rôle dans les infections causées par des pathogènes reste encore flou. Récemment, il a été reporté que ces cellules joueraient un rôle clef dans l'immunosuppression induite par la souche virulente *Plasmodium yoelii* 17XL ainsi que dans la virulence de ce parasite. En revanche, les Tregs sembleraient moins impliquées dans les infections par la souche non virulente homologue *Plasmodium yoelii* 17XNL. Nous avons voulu réévaluer ces résultats en suivant la dynamique de la population des Tregs spléniques au cours d'infection par quatre souches de *Plasmodium* murines : deux virulentes (*P. yoelii* YM et *P. chabaudi adami* DS) et deux non virulentes (*P. yoelii* 17XNL et *P. chabaudi adami* DK). Nos résultats, supportés par trois analyses distinctes (étude de l'expression du gène Foxp3 par RT-RT-PCR, analyse phénotypique des cellules CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD45RB<sup>low</sup> et enfin des cellules CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> par cryométrie en flux), montrent qu'à haute parasitémie la proportion des Tregs au sein des lymphocytes spléniques diminue de manière significative. De manière surprenante, cette diminution est similaire chez les souches virulentes et non virulentes. Pour tirer des conclusions plus précises, l'activité suppressive des Tregs pendant les différentes infections devra être étudiée.

## Rodent malaria: In search for correlations between T cell dysfunction and/or immunosuppressive phenotype with parasite virulence

Cambos Mathieu<sup>1</sup>, Roulet Alain<sup>2</sup>, Scorza Tatiana<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 6<sup>ème</sup> Symposium de Parasitologie du Québec, Ste-Anne-de-Bellevue (Canada), 18 mai 2006  
(poster présentation).

### Abstract

Malaria infections have been linked to increased susceptibility to bacterial and viral diseases and reduced responsiveness to vaccines. Although antigen presenting cell (APC) dysfunction and suppressor-regulatory T cells activity have been both associated to the down-regulation of acquired immunity during *Plasmodium* infection, the role of these two parameters in respect to parasite virulence remain rather conflicting.

In the present study, the functional and suppressive state of splenic accessory cells and T cells from BALB/c mice with peak infection were assessed using virulent and avirulent parasite strains belonging to the *P. c. adami* (DS, virulent and DK, avirulent) and *P. yoelii* (YM, virulent and 17XNL, avirulent) species. IFN- $\gamma$  responses following ConA stimulation were dramatically impaired when using T cells from mice with acute *P. c. adami* infection as effector cells or naïve T cells co-cultured with macrophages from mice with acute infection, and the effect was shown to be independent of the parasite strain virulence.

The suppressive effect of splenic T cells and accessory cells from *Plasmodium*-infected mice were studied in co-culture experiments that used ConA or soluble anti CD3 monoclonal antibody and naïve accessory cells as stimulators, and CFSE-labeled purified naïve T cells as responder cells. A first set of experiments revealed a significant drop in the stimulation index of naïve T cells exclusively when these cells were co-cultured in the presence of purified T cells from *P. c. adami* DS (virulent) infected mice, or when using the accessory (thyl<sup>+</sup>) cell fraction from infected mice. Interestingly, in the presence of splenic T cells or accessory cells from *P. yoelii* YM and 17XNL or *P. c. adami* DK infected mice ConA-induced blastogenic

responses were up-regulated whereas no effect was observed when using an anti CD3 monoclonal antibody as stimuli.

In parallel, the percentage of natural regulatory (FOXP3<sup>+</sup>) splenic T cells during acute infection with the avirulent and virulent *Plasmodium* strains were measured and compared using intracellular staining with an anti-FOXP3 monoclonal antibody. Infections with all four parasite strains resulted in dramatic drops in CD4<sup>+</sup> T cells expressing FOXP3 at the time of peak parasitemia (P, a result that was previously reported in our laboratory by real time RT-PCR analysis of FOXP3 mRNA expression, whereas no effect was observed in the minor population of CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells.

Our results suggest that acute malaria infections, independently of the parasite virulence render T cells and accessory cells dysfunctional, and that this impairment is not necessarily accompanied by the acquisition of a suppressive phenotype when assessing polyclonal T cell activation. We are currently addressing the nature of the down-regulation of FOXP3<sup>+</sup> T cells and evaluating the impact of this particular cell population of suppressive T cells during infection in depletion/repletion experiments.

## Malaria-induced immunosuppression: metabolites involved, mechanisms of action and role of regulatory T cells

Cambos Mathieu<sup>1</sup>, M.C. St-Louis<sup>1</sup>, A. Jardim<sup>2</sup>, Scorza Tatiana<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, <sup>2</sup>McGill University.

Résumé au 5<sup>ème</sup> Symposium de Parasitologie du Québec, Montréal (Canada), 12-13 juin 2006 (poster présentation).

### Abstract

There is an urgent need for vaccines capable of controlling malaria, a disease that kills 1-3 million people annually. *Plasmodium* parasites have developed strategies to evade immunity. Understanding of the mechanisms involved in the downregulation of immunity remains essential for the success of vaccination campaigns. There are recent reports of the suppressive properties of *Plasmodium* parasites on the induction of CD8<sup>+</sup> T cell responses to the liver stages of infection. In addition, Hisaeda *et al.* have assigned a pivotal role to regulatory T cells (Treg cells) in the immunosuppression and virulence associated with *Plasmodium yoelii* infections. We are interested in three essential aspects of malaria-associated immunosuppression, which are being addressed using virulent and non-virulent malaria infection models (*P. y. yoelii*, *P. c. adami*).

- A. The identification of *Plasmodium* metabolites with immunosuppressive properties.
- B. The effect of these metabolites on APCs and effector (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) T cells.
- C. The role of Treg cells in the outcome of protective immunity.

The dynamics of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>intermediate-low</sup> populations during *P. c. adami* infections (virulent DS and non-virulent DK strains) has been followed. Preliminary results indicate a significant decrease in the numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>intermediate-low</sup> T cells during infection with the DS and DK strains ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively). In order to determine if Treg cells follow a similar trend, we are analyzing by semi-quantitative RT-PCR the expression of FOXP3, exclusive of Treg cells. Analysis of the modulator properties of purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *in vivo* will allow defining their suppressive phenotype.

Suppressive properties of parasite fractions have been assessed using a stimulation assay with splenic T cells and the SEB superantigen. Significant inhibition in IL-2 production has been associated with parasite proteins. Characterization of these suppressive molecules and their interaction with APC and Treg cells is being evaluated.

## BIBLIOGRAPHIE

Abdalla, S., D.J. Weatherall, S.N. Wickramasinghe et M. Hughes. 1980. "The anaemia of *P. falciparum* malaria". *Br J Haematol*, 46 (2): 171-83.

Achtman, A.H., R. Stephens, E.T. Cadman, V. Harrison et J. Langhorne. 2007. "Malaria-specific antibody responses and parasite persistence after infection of mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi*". *Parasite Immunol*, 29 (9): 435-44.

Ackerman, H.C., S.D. Beaudry et R.M. Fairhurst. 2009. "Antioxidant therapy: reducing malaria severity?" *Crit Care Med*, 37 (2): 758-60.

Adu, D., D.G. Williams, I.A. Quakyi, A. Voller, Y. Anim-Addo, A.A. Bruce-Tagoe, G.D. Johnson et E.J. Holborow. 1982. "Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria". *Clin Exp Immunol*, 49 (2): 310-6.

Ageely, H.M., H.A. Dawoud et A.A. Heiba. 2008. "Anemia, interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels in children with acute, complicated and uncomplicated malignant malaria in Jazan, Saudi Arabia". *J Egypt Soc Parasitol*, 38 (2): 359-70.

Ahvazi, B.C., P. Jacobs et M.M. Stevenson. 1995. "Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria". *J Leukoc Biol*, 58 (1): 23-31.

Akbar, A.N., L.S. Taams, M. Salmon et M. Vukmanovic-Stejic. 2003. "The peripheral generation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells". *Immunology*, 109 (3): 319-25.

Alber, G., S. Al-Robaiy, M. Kleinschek, J. Knauer, P. Krumbholz, J. Richter, S. Schoeneberger, N. Schuetze, S. Schulz, K. Toepfer, R. Voigtlaender, J. Lehmann et U. Mueller. 2006. "Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members". *Ernst Schering Res Found Workshop* (56): 107-27.

Alcouffe, J., N. Therville, B. Segui, D. Nazzari, N. Blaes, R. Salvayre, M. Thomsen et H. Benoist. 2004. "Expression of membrane-bound and soluble FasL in Fas- and FADD-dependent T lymphocyte apoptosis induced by mildly oxidized LDL". *Faseb J*, 18 (1): 122-4.

Alegre, M.L., K.A. Frauwirth et C.B. Thompson. 2001. "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4". *Nat Rev Immunol*, 1 (3): 220-8.

Amante, F.H., A.C. Stanley, L.M. Randall, Y. Zhou, A. Haque, K. McSweeney, A.P. Waters, C.J. Janse, M.F. Good, G.R. Hill et C.R. Engwerda. 2007. "A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria". *Am J Pathol*, 171 (2): 548-59.



- Amodu, O.K., A.A. Adeyemo, P.E. Olumese et R.A. Gbadegesin. 1998. "Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92 (1): 54-6.
- Andrade, B.B., T. Araujo-Santos, N.F. Luz, R. Khouri, M.T. Bozza, L.M. Camargo, A. Barral, V.M. Borges et M. Barral-Netto. 2010. "Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria". *J Immunol*, 185 (2): 1196-204.
- Angulo, I. et M. Fresno. 2002. "Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria". *Clin Diagn Lab Immunol*, 9 (6): 1145-52.
- Annacker, O., C. Asseman, S. Read et F. Powrie. 2003. "Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis". *J Autoimmun*, 20 (4): 277-9.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano et A. Bandeira. 2001. "CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10". *J Immunol*, 166 (5): 3008-18.
- Anstey, N.M., M.Y. Hassanali, J. Mlalani, D. Manyenga et E.D. Mwaikambo. 1996. "Elevated levels of methaemoglobin in Tanzanian children with severe and uncomplicated malaria". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90 (2): 147-51.
- Antony, P.A., C.M. Paulos, M. Ahmadzadeh, A. Akpinarli, D.C. Palmer, N. Sato, A. Kaiser, C.S. Hinrichs, C.A. Klebanoff, Y. Tagaya et N.P. Restifo. 2006. "Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo". *J Immunol*, 176 (9): 5255-66.
- Apostolou, I. et H. von Boehmer. 2004. "In vivo instruction of suppressor commitment in naïve T cells". *J Exp Med*, 199 (10): 1401-8.
- Aramaki, Y., S. Yotsumoto, H. Watanabe et S. Tsuchiya. 2002. "NADPH-oxidase may contribute to IL-12 production in macrophages stimulated with CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotides". *Biol Pharm Bull*, 25 (3): 351-5.
- Arese, P., F. Turrini et H. Ginsburg. 1991. "Erythrophagocytosis in malaria: Host defence or menace to the macrophage?" *Parasitol Today*, 7 (1): 25-8.
- Aribot, G., C. Rogier, J.L. Sarthou, J.F. Trape, A.T. Balde, P. Druilhe et C. Roussilhon. 1996. "Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa)". *Am J Trop Med Hyg*, 54 (5): 449-57.
- Arruda, M.A., A.G. Rossi, M.S. de Freitas, C. Barja-Fidalgo et A.V. Graca-Souza. 2004. "Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB". *J Immunol*, 173 (3): 2023-30.

- Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren et E.M. Riley. 2003. "The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology". *Clin Exp Immunol*, 133 (2): 145-52.
- Asadullah, K., W. Sterry et H.D. Volk. 2003. "Interleukin-10 therapy--review of a new approach". *Pharmacol Rev*, 55 (2): 241-69.
- Aste-Amezaga, M., X. Ma, A. Sartori et G. Trinchieri. 1998. "Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10". *J Immunol*, 160 (12): 5936-44.
- Atamna, H. et H. Ginsburg. 1993. "Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*". *Mol Biochem Parasitol*, 61 (2): 231-41.
- Atoji, T., M. Aihara, H. Sakai, E. Tsuchida et S. Takeoka. 2006. "Hemoglobin vesicles containing methemoglobin and L-tyrosine to suppress methemoglobin formation in vitro and in vivo". *Bioconjug Chem*, 17 (5): 1241-5.
- Aucan, C., Y. Traore, F. Fumoux et P. Rihet. 2001. "Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Burkina Faso". *Infect Immun*, 69 (2): 996-1001.
- Awandare, G.A., J.B. Hittner, P.G. Kremsner, D.O. Ochiel, C.C. Keller, J.B. Weinberg, I.A. Clark et D.J. Perkins. 2006. "Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with *Plasmodium falciparum* malaria". *Clin Immunol*, 119 (2): 219-25.
- Awandare, G.A., Y. Ouma, C. Ouma, T. Were, R. Otieno, C.C. Keller, G.C. Davenport, J.B. Hittner, J. Vulule, R. Ferrell, J.M. Ong'echa et D.J. Perkins. 2007. "Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia". *Infect Immun*, 75 (1): 201-10.
- Bach, F.H. 2005. "Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel". *Faseb J*, 19 (10): 1216-9.
- Balde, A.T., G. Aribot, A. Tall, A. Spiegel et C. Roussilhon. 2000. "Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection". *Parasite Immunol*, 22 (6): 307-18.
- Baliraine, F.N., Y.A. Afrane, D.A. Ameny, M. Bonizzoni, A.M. Vardo-Zalik, D.M. Menge, A.K. Githeko et G. Yan. 2010. "A cohort study of *Plasmodium falciparum* infection dynamics in Western Kenya Highlands". *BMC Infect Dis*, 10 (1): 283-293.
- Balla, G., H.S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J.W. Eaton et G.M. Vercellotti. 1992. "Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium". *J Biol Chem*, 267 (25): 18148-53.

- Balla, G., G.M. Vercellotti, J.W. Eaton et H.S. Jacob. 1990. "Iron loading of endothelial cells augments oxidant damage". *J Lab Clin Med*, 116 (4): 546-54.
- Balla, J., G. Balla, V. Jeney, G. Kakuk, H.S. Jacob et G.M. Vercellotti. 2000. "Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants". *Blood*, 95 (11): 3442-50.
- Balmer, P., J. Alexander et R.S. Phillips. 2000. "Protective immunity to erythrocytic *Plasmodium chabaudi* AS infection involves IFN $\gamma$ -mediated responses and a cellular infiltrate to the liver". *Parasitology*, 121 Pt 5: 473-82.
- Baranano, D.E., H. Wolosker, B.I. Bae, R.K. Barrow, S.H. Snyder et C.D. Ferris. 2000. "A mammalian iron ATPase induced by iron". *J Biol Chem*, 275 (20): 15166-73.
- Barber, D.L., E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe, G.J. Freeman et R. Ahmed. 2006. "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection". *Nature*, 439 (7077): 682-7.
- Barbour, A.G. et B.I. Restrepo. 2000. "Antigenic variation in vector-borne pathogens". *Emerg Infect Dis*, 6 (5): 449-57.
- Basilico, N., C. Tognazioli, S. Picot, F. Ravagnani et D. Taramelli. 2003. "Synergistic and antagonistic interactions between haemozoin and bacterial endotoxin on human and mouse macrophages". *Parassitologia*, 45 (3-4): 135-40.
- Bastos, K.R., R. Barboza, R.M. Elias, L.R. Sardinha, M.G. Grisotto, C.R. Marinho, G.P. Amarante-Mendes, J.M. Alvarez et M.R. Lima. 2002. "Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria in interleukin-12-deficient mice". *J Interferon Cytokine Res*, 22 (12): 1191-9.
- Becker, K., L. Tilley, J.L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson et H. Ginsburg. 2004. "Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions". *Int J Parasitol*, 34 (2): 163-89.
- Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach et D.L. Sacks. 2002. "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity". *Nature*, 420 (6915): 502-7.
- Belkaid, Y. et B.T. Rouse. 2005. "Natural regulatory T cells in infectious disease". *Nat Immunol*, 6 (4): 353-60.
- Belkaid, Y., C.M. Sun et N. Bouladoux. 2006. "Parasites and immunoregulatory T cells". *Curr Opin Immunol*, 18 (4): 406-12.
- Belkaid, Y. et K. Tarbell. 2009. "Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions". *Annu Rev Immunol*, 27: 551-89.

Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance et H.D. Ochs. 2001. "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3". *Nat Genet*, 27 (1): 20-1.

Bennett, G.D. et M.M. Kay. 1981. "Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages". *Exp Hematol*, 9 (3): 297-307.

Bennett, I.L. et E.W. Hook. 1959. "Infectious diseases (some aspects of Salmonellosis)". *Annual Review of Medicine*, 16: 1-19.

Benson, M.J., K. Pino-Lagos, M. Roseblatt et R.J. Noelle. 2007. "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation". *J Exp Med*, 204 (8): 1765-74.

Bergamaschi, G., A. Di Sabatino, R. Albertini, S. Ardizzone, P. Biancheri, E. Bonetti, A. Cassinotti, P. Cazzola, K. Markopoulos, A. Massari, V. Rosti, G. Bianchi Porro et G.R. Corazza. 2009. "Prevalence and pathogenesis of anemia in Inflammatory Bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  treatment". *Haematologica*.

Berlin, N.I. 1964. "Determination of Red Blood Cell Life Span". *Jama*, 188: 375-8.

Betelli, E., M. Dastrange et M. Oukka. 2005. "Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (14): 5138-43.

Bhattacharyya, S., P. Sen, M. Wallet, B. Long, A.S. Baldwin, Jr. et R. Tisch. 2004. "Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity". *Blood*, 104 (4): 1100-9.

Bhoite-Solomon, V., G. Kessler-Icekson et N. Shaklai. 1993. "Myocyte injury by hemin". *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 29A (8): 636-42.

Bissell, D.M., L. Hammaker et R. Schmid. 1972. "Liver sinusoidal cells. Identification of a subpopulation for erythrocyte catabolism". *J Cell Biol*, 54 (1): 107-19.

Biswas, P.S., V. Pedicord, A. Ploss, E. Menet, I. Leiner et E.G. Pamer. 2007. "Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10". *J Immunol*, 179 (7): 4520-8.

Blattman, J.N. et P.D. Greenberg. 2006. "PD-1 blockade: rescue from a near-death experience". *Nat Immunol*, 7 (3): 227-8.

Bogdan, C., J. Paik, Y. Vodovotz et C. Nathan. 1992. "Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10". *J Biol Chem*, 267 (32): 23301-8.

- Boon, T., J.C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen et A. Van Pel. 1994. "Tumor antigens recognized by T lymphocytes". *Annu Rev Immunol*, 12: 337-65.
- Boubou, M.I., A. Collette, D. Voegtli, D. Mazier, P.A. Cazenave et S. Pied. 1999. "T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria". *Int Immunol*, 11 (9): 1553-62.
- Bouharoun-Tayoun, H., P. Attanath, A. Sabchareon, T. Chongsuphajaisiddhi et P. Druilhe. 1990. "Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes". *J Exp Med*, 172 (6): 1633-41.
- Bouharoun-Tayoun, H. et P. Druilhe. 1992. "Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality?" *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 3: 229-34.
- Bouharoun-Tayoun, H. et P. Druilhe. 1992. "Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity". *Infect Immun*, 60 (4): 1473-81.
- Bouharoun-Tayoun, H., C. Oeuvray, F. Lunel et P. Druilhe. 1995. "Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages". *J Exp Med*, 182 (2): 409-18.
- Brasseur, P., M. Agrapart, J.J. Ballet, P. Druilhe, M.J. Warrell et S. Tharavanij. 1983. "Impaired cell-mediated immunity in Plasmodium falciparum-infected patients with high-parasitemia and cerebral malaria". *Clin Immunol Immunopathol*, 27 (1): 38-50.
- Bratosin, D., J. Mazurier, J.P. Tissier, J. Estaquier, J.J. Huart, J.C. Ameisen, D. Aminoff et J. Montreuil. 1998. "Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review". *Biochimie*, 80 (2): 173-95.
- Braun, N., Y. Marfo, C. Von Gartner, G.D. Burchard, P.F. Zipfel, N.E. Browne, B. Fleischer et B.M. Broker. 2003. "CTLA-4 positive T cells in contrast to procalcitonin plasma levels discriminate between severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Ghanaian children". *Trop Med Int Health*, 8 (11): 1018-24.
- Braverman, S., C. Helson et L. Helson. 1995. "Hemin toxicity in a human epithelioid sarcoma cell line". *Anticancer Res*, 15 (5B): 1963-7.
- Brogdon, W.G. et J.C. McAllister. 2004. "Insecticide resistance and vector control". *J Agromedicine*, 9 (2): 329-45.
- Brown, G.V., H.P. Beck, M. Molyneux et K. Marsh. 2000. "Molecular approaches to epidemiology and clinical aspects of malaria". *Parasitol Today*, 16 (10): 448-51.
- Brown, K.M. et J.P. Kreier. 1986. "Effect of macrophage activation on phagocyte-Plasmodium interaction". *Infect Immun*, 51 (3): 744-9.

- Brown, W.H. 1911. "Malarial Pigment (So-Called Melanin): Its Nature and Mode of Production". *J Exp Med*, 13 (2): 290-299.
- Browne, P., O. Shalev et R.P. Hebbel. 1998. "The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model". *Free Radic Biol Med*, 24 (6): 1040-8.
- Browne, P.V., O. Shalev, F.A. Kuypers, C. Brugnara, A. Solovey, N. Mohandas, S.L. Schrier et R.P. Hebbel. 1997. "Removal of erythrocyte membrane iron in vivo ameliorates the pathobiology of murine thalassemia". *J Clin Invest*, 100 (6): 1459-64.
- Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler et F. Ramsdell. 2001. "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse". *Nat Genet*, 27 (1): 68-73.
- Brunt, K.R., M.R. Tsuji, J.H. Lai, R.T. Kinobe, W. Durante, W.C. Claycomb, C.A. Ward et L.G. Melo. 2009. "Heme oxygenase-1 inhibits pro-oxidant induced hypertrophy in HL-1 cardiomyocytes". *Exp Biol Med (Maywood)*, 234 (5): 582-94.
- Buck, I., F. Morceau, S. Cristofanon, C. Heintz, S. Chateauvieux, S. Reuter, M. Dicato et M. Diederich. 2008. "Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation". *Biochem Pharmacol*, 76 (10): 1229-39.
- Bunn, H.F. et J.H. Jandl. 1968. "Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin". *J Biol Chem*, 243 (3): 465-75.
- Buss, J.L., J. Neuzil et P. Ponka. 2004. "Oxidative stress mediates toxicity of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs". *Arch Biochem Biophys*, 421 (1): 1-9.
- Butcher, G.A. et I.A. Clark. 1990. "The inhibition of Plasmodium falciparum growth in vitro by sera from mice infected with malaria or treated with TNF". *Parasitology*, 101 Pt 3: 321-6.
- Cambos, M., S. Bazinet, E. Abed, J. Sanchez-Dardon, C. Bernard, R. Moreau, O.M. Martin et T. Scorza. 2010. "The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages". *Int J Parasitol*.
- Cambos, M., B. Belanger, A. Jacques, A. Roulet et T. Scorza. 2008. "Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP3+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during Plasmodium chabaudi adami infection and do not contribute to immune evasion". *Int J Parasitol*, 38 (2): 229-38.
- Cambos, M. et T. Scorza. 2011. "Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders". *J Leukoc Biol*, 89: 1-13.
- Camejo, G., C. Halberg, A. Manschik-Lundin, E. Hurt-Camejo, B. Rosengren, H. Olsson, G.I. Hansson, G.B. Forsberg et B. Ylhen. 1998. "Hemin binding and oxidation of lipoproteins

in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages". *J Lipid Res*, 39 (4): 755-66.

Campino, S., J. Forton, S. Auburn, A. Fry, M. Diakite, A. Richardson, J. Hull, M. Jallow, F. Sisay-Joof, M. Pinder, M.E. Molyneux, T.E. Taylor, K. Rockett, T.G. Clark et D.P. Kwiatkowski. 2009. "TLR9 polymorphisms in African populations: no association with severe malaria, but evidence of cis-variants acting on gene expression". *Malar J*, 8: 44.

Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnica-Worms et T.J. Ley. 2007. "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance". *Immunity*, 27 (4): 635-46.

Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury et J. Demengeot. 2003. "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide". *J Exp Med*, 197 (4): 403-11.

Carlson, J., H. Helmby, A.V. Hill, D. Brewster, B.M. Greenwood et M. Wahlgren. 1990. "Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies". *Lancet*, 336 (8729): 1457-60.

Caro, J.J., M. Salas, A. Ward et G. Goss. 2001. "Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review". *Cancer*, 91 (12): 2214-21.

Carter, R. et D. Walliker. 1976. "Malaria parasites of rodents of the Congo (Brazzaville): *Plasmodium chabaudi adami* subsp. nov. and *Plasmodium vinckei lentum* Landau, Michel, Adam and Boulard, 1970". *Ann Parasitol Hum Comp*, 51 (6): 637-46.

Casals-Pascual, C., O. Kai, J.O. Cheung, S. Williams, B. Lowe, M. Nyanoti, T.N. Williams, K. Maitland, M. Molyneux, C.R. Newton, N. Peshu, S.M. Watt et D.J. Roberts. 2006. "Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo". *Blood*.

Cederbom, L., H. Hall et F. Ivars. 2000. "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells". *Eur J Immunol*, 30 (6): 1538-43.

Chaisavaneeyakorn, S., C. Othoro, Y.P. Shi, J. Otieno, S.C. Chaiyaroj, A.A. Lal et V. Udhayakumar. 2003. "Relationship between plasma Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya". *Clin Diagn Lab Immunol*, 10 (3): 362-6.

Chaiyaroj, S.C., A.S. Rutta, K. Muenthaisong, P. Watkins, M. Na Ubol et S. Looareesuwan. 2004. "Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria". *Acta Trop*, 89 (3): 319-27.

Chang, K.H. et M.M. Stevenson. 2004. "Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria". *Int J Parasitol*, 34 (13-14): 1501-16.

- Charunwatthana, P., M. Abul Faiz, R. Ruangveerayut, R.J. Maude, M.R. Rahman, L.J. Roberts, 2nd, K. Moore, E. Bin Yunus, M.G. Hoque, M.U. Hasan, S.J. Lee, S. Pukrittayakamee, P.N. Newton, N.J. White, N.P. Day et A.M. Dondorp. 2009. "N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized, double-blinded placebo-controlled clinical trial". *Crit Care Med*, 37 (2): 516-22.
- Chatterjee, S., J.L. Perignon, E. Van Marck et P. Druilhe. 2006. "How reliable are models for malaria vaccine development? Lessons from irradiated sporozoite immunizations". *J Postgrad Med*, 52 (4): 321-4.
- Chauveau, C., S. Remy, P.J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F.X. Hubert, L. Tesson, R. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, R. Josien, M.C. Cuturi et I. Anegon. 2005. "Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression". *Blood*, 106 (5): 1694-702.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady et S.M. Wahl. 2003. "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3". *J Exp Med*, 198 (12): 1875-86.
- Chiang, T.M., M.L. Alkan et E.H. Beachey. 1979. "Binding of lipoteichoic acid of group A streptococci to isolated human erythrocyte membranes". *Infect Immun*, 26 (1): 316-21.
- Chiu, D., F. Kuypers et B. Lubin. 1989. "Lipid peroxidation in human red cells". *Semin Hematol*, 26 (4): 257-76.
- Chiu, D. et B. Lubin. 1989. "Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: the effect of heme on red cell membranes". *Semin Hematol*, 26 (2): 128-35.
- Choi, A.M. et J. Alam. 1996. "Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury". *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15 (1): 9-19.
- Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, J.A. Simpson, P. Newton, S. Pukrittayakamee, S. Looareesuwan et N.J. White. 2000. "Parasite multiplication potential and the severity of Falciparum malaria". *J Infect Dis*, 181 (3): 1206-9.
- Clark, I.A., A.C. Budd, L.M. Alleva et W.B. Cowden. 2006. "Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release". *Malar J*, 5: 85.
- Clark, I.A. et G. Chaudhri. 1988. "Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis". *Br J Haematol*, 70 (1): 99-103.
- Clark, I.A., G. Chaudhri et W.B. Cowden. 1989. "Some roles of free radicals in malaria". *Free Radic Biol Med*, 6 (3): 315-21.



- Clark, I.A. et W.B. Cowden. 2003. "The pathophysiology of falciparum malaria". *Pharmacol Ther*, 99 (2): 221-60.
- Clerget, M. et B.S. Polla. 1990. "Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (3): 1081-5.
- Clyde, D.F., V.C. McCarthy, R.M. Miller et R.B. Hornick. 1973. "Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria". *Am J Med Sci*, 266 (6): 398-403.
- Clyde, D.F., H. Most, V.C. McCarthy et J.P. Vanderberg. 1973. "Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria". *Am J Med Sci*, 266 (3): 169-77.
- Coban, C., K.J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii et S. Akira. 2005. "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin". *J Exp Med*, 201 (1): 19-25.
- Coban, C., K.J. Ishii, S. Uematsu, N. Arisue, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kawai, O. Takeuchi, H. Hisaeda, T. Horii et S. Akira. 2007. "Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria". *Int Immunol*, 19 (1): 67-79.
- Cockburn, I.A. et F. Zavala. 2007. "T cell memory in malaria". *Curr Opin Immunol*, 19 (4): 424-9.
- Cohen, S., G.I. Mc et S. Carrington. 1961. "Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria". *Nature*, 192: 733-7.
- Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehry, R.S. Blumberg et D.A. Vignali. 2007. "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function". *Nature*, 450 (7169): 566-9.
- Commins, L.M., D.J. Loegering et P.W. Gudewicz. 1990. "Effect of phagocytosis of erythrocytes and erythrocyte ghosts on macrophage phagocytic function and hydrogen peroxide production". *Inflammation*, 14 (6): 705-16.
- Cook, I.F. 1985. "Herpes zoster in children following malaria". *J Trop Med Hyg*, 88 (4): 261-4.
- Coombes, J.L., K.R. Siddiqui, C.V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C.M. Sun, Y. Belkaid et F. Powrie. 2007. "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism". *J Exp Med*, 204 (8): 1757-64.
- Correa, M., P.R. Narayanan et H.C. Miller. 1980. "Suppressive activity of splenic adherent cells from Plasmodium chabaudi-infected mice". *J Immunol*, 125 (2): 749-54.

Couper, K.N., D.G. Blount, J.C. Hafalla, N. van Rooijen, J.B. de Souza et E.M. Riley. 2007. "Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia". *Infect Immun*, 75 (12): 5806-18.

Couper, K.N., D.G. Blount, M.S. Wilson, J.C. Hafalla, Y. Belkaid, M. Kamanaka, R.A. Flavell, J.B. de Souza et E.M. Riley. 2008. "IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection". *PLoS Pathog*, 4 (2): e1000004.

Cowman, A.F. et S.J. Foote. 1990. "Chemotherapy and drug resistance in malaria". *Int J Parasitol*, 20 (4): 503-13.

Creagh, E.M. et L.A. O'Neill. 2006. "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity". *Trends Immunol*, 27 (8): 352-7.

Cross, A.S. 2002. "Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective". *J Endotoxin Res*, 8 (2): 83-98.

Cross, C.E. et J. Langhorne. 1998. "*Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice". *Exp Parasitol*, 90 (3): 220-9.

D'Andrea, A., M. Rengaraju, N.M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S.H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg et et al. 1992. "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells". *J Exp Med*, 176 (5): 1387-98.

da Silva, J.L., T. Morishita, B. Escalante, R. Staudinger, G. Drummond, M.S. Goligorsky, J.D. Lutton et N.G. Abraham. 1996. "Dual role of heme oxygenase in epithelial cell injury: contrasting effects of short-term and long-term exposure to oxidant stress". *J Lab Clin Med*, 128 (3): 290-6.

Das, B.S. et N.K. Nanda. 1999. "Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute falciparum malaria". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93 (1): 58-62.

Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman et B.D. Walker. 2006. "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression". *Nature*, 443 (7109): 350-4.

de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger et A. Scheffold. 2004. "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function". *Eur. J. Immunol*, 34: 2480-2488.

Deans, A.M., K.E. Lyke, M.A. Thera, C.V. Plowe, A. Kone, O.K. Doumbo, O. Kai, K. Marsh, M.J. Mackinnon, A. Raza et J.A. Rowe. 2006. "Low multiplication rates of African

Plasmodium falciparum isolates and lack of association of multiplication rate and red blood cell selectivity with malaria virulence". *Am J Trop Med Hyg*, 74 (4): 554-63.

Delaby, C., N. Pilard, G. Hetet, F. Driss, B. Grandchamp, C. Beaumont et F. Canonne-Hergaux. 2005. "A physiological model to study iron recycling in macrophages". *Exp Cell Res*, 310 (1): 43-53.

DeLeo, F.R. 2004. "Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens". *Apoptosis*, 9 (4): 399-413.

DeLeo, F.R., L.A. Allen, M. Apicella et W.M. Nauseef. 1999. "NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis". *J Immunol*, 163 (12): 6732-40.

Demengeot, J., S. Zelenay, M.F. Moraes-Fontes, I. Caramalho et A. Coutinho. 2006. "Regulatory T cells in microbial infection". *Springer Semin Immunopathol*, 28 (1): 41-50.

Denys, A., I.A. Udalova, C. Smith, L.M. Williams, C.J. Ciesielski, J. Campbell, C. Andrews, D. Kwaitkowski et B.M. Foxwell. 2002. "Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages". *J Immunol*, 168 (10): 4837-45.

Desbuides, N., G.Y. Rochefort, D. Schlecht, M.C. Machet, J.M. Halimi, V. Eder, J.M. Hyvelin et D. Antier. 2007. "Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis". *Thromb Haemost*, 98 (3): 614-20.

Deshpande, P. et P. Shastri. 2004. "Modulation of cytokine profiles by malaria pigment--hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC". *Cytokine*, 28 (6): 205-13.

Desowitz, R.S. 2000. "The malaria vaccine: seventy years of the great immune hope". *Parassitologia*, 42 (1-2): 173-82.

Dieckmann, D., C.H. Bruett, H. Ploettner, M.B. Lutz et G. Schuler. 2002. "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]". *J Exp Med*, 196 (2): 247-53.

Dieckmann, D., H. Plottnr, S. Berchtold, T. Berger et G. Schuler. 2001. "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood". *J Exp Med*, 193 (11): 1303-10.

Dkhil, M.A. 2009. "Apoptotic changes induced in mice splenic tissue due to malaria infection". *J Microbiol Immunol Infect*, 42 (1): 13-8.

Dobashi, K., M. Aihara, T. Araki, Y. Shimizu, M. Utsugi, K. Iizuka, Y. Murata, J. Hamuro, T. Nakazawa et M. Mori. 2001. "Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-

gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages". *Clin Exp Immunol*, 124 (2): 290-6.

Dobrovolskaia, M.A. et S.N. Vogel. 2002. "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS". *Microbes Infect*, 4 (9): 903-14.

Dodoo, D., F.M. Omer, J. Todd, B.D. Akanmori, K.A. Koram et E.M. Riley. 2002. "Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria". *J Infect Dis*, 185 (7): 971-9.

Donati, D., L.P. Zhang, A. Chene, Q. Chen, K. Flick, M. Nystrom, M. Wahlgren et M.T. Bejarano. 2004. "Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*". *Infect Immun*, 72 (9): 5412-8.

Dondorp, A.M., B.J. Angus, K. Chotivanich, K. Silamut, R. Ruangveerayuth, M.R. Hardeman, P.A. Kager, J. Vreeken et N.J. White. 1999. "Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria". *Am J Trop Med Hyg*, 60 (5): 733-7.

Dondorp, A.M., K.T. Chotivanich, S. Fucharoen, K. Silamut, J. Vreeken, P.A. Kager et N.J. White. 1999. "Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia". *Br J Haematol*, 105 (2): 505-8.

Drechsler, Y., A. Dolganiuc, O. Norkina, L. Romics, W. Li, K. Kodys, F.H. Bach, P. Mandrekar et G. Szabo. 2006. "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes". *J Immunol*, 177 (4): 2592-600.

Druilhe, P. et S. Khusmith. 1987. "Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status". *Infect Immun*, 55 (4): 888-91.

Druilhe, P. et J.L. Perignon. 1994. "Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans". *Immunol Lett*, 41 (2-3): 115-20.

Du, C. et S. Sriram. 1998. "Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells". *J Leukoc Biol*, 64 (1): 92-7.

Dunn, G.P., L.J. Old et R.D. Schreiber. 2004. "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting". *Immunity*, 21 (2): 137-48.

Dybedal, I., S. Larsen et S.E. Jacobsen. 1995. "IL-12 directly enhances in vitro murine erythropoiesis in combination with IL-4 and stem cell factor". *J Immunol*, 154 (10): 4950-5.

Eaton, J.W. et M. Qian. 2002. "Molecular bases of cellular iron toxicity". *Free Radic Biol Med*, 32 (9): 833-40.

- Eddahri, F., G. Oldenhove, S. Denanglaire, J. Urbain, O. Leo et F. Andris. 2006. "CD4+ CD25+ regulatory T cells control the magnitude of T-dependent humoral immune responses to exogenous antigens". *Eur J Immunol*, 36 (4): 855-63.
- Egan, A.F., P. Burghaus, P. Druilhe, A.A. Holder et E.M. Riley. 1999. "Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro". *Parasite Immunol*, 21 (3): 133-9.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. **35**: 495-516.
- Engwerda, C.R., T.L. Mynott, S. Sawhney, J.B. De Souza, Q.D. Bickle et P.M. Kaye. 2002. "Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria". *J Exp Med*, 195 (10): 1371-7.
- Fahey, J.R. et G.L. Spitalny. 1987. "Rapid parasite multiplication rate, rather than immunosuppression, causes the death of mice infected with virulent Plasmodium yoelii". *Infect Immun*, 55 (2): 490-3.
- Falanga, P.B. et L. Pereira da Silva. 1989. "Acute virulent infection with Plasmodium chabaudi does not impair the generation of a protective immune response". *Parasite Immunol*, 11 (6): 603-13.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre et P. Puccetti. 2003. "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells". *Nat Immunol*, 4 (12): 1206-12.
- Farooq, U. et R.C. Mahajan. 2004. "Drug resistance in malaria". *J Vector Borne Dis*, 41 (3-4): 45-53.
- Felli, N., F. Pedini, A. Zeuner, E. Petrucci, U. Testa, C. Conticello, M. Biffoni, A. Di Cataldo, J.A. Winkles, C. Peschle et R. De Maria. 2005. "Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis". *J Immunol*, 175 (3): 1464-72.
- Feng, W.G., Y.B. Wang, J.S. Zhang, X.Y. Wang, C.L. Li et Z.L. Chang. 2002. "cAMP elevators inhibit LPS-induced IL-12 p40 expression by interfering with phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages". *Cell Res*, 12 (5-6): 331-7.
- Ferrante, A., L. Kumaratilake, C.M. Rzepczyk et J.M. Dayer. 1990. "Killing of Plasmodium falciparum by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages)". *Immunol Lett*, 25 (1-3): 179-87.
- Ferraroni, J.J., F.H. Alencar et R. Shrimpton. 1983. "Multiple drug resistance in falciparum malaria from Brazil". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77 (1): 138-9.

- Ferreira, A., J. Balla, V. Jeney, G. Balla et M.P. Soares. 2008. "A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?" *J Mol Med*, 86 (10): 1097-1111.
- Ferreira, A., L. Schofield, V. Enea, H. Schellekens, P. van der Meide, W.E. Collins, R.S. Nussenzweig et V. Nussenzweig. 1986. "Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon". *Science*, 232 (4752): 881-4.
- Ferreira, M.U., E.A. Kimura, J.M. De Souza et A.M. Katzin. 1996. "The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-Plasmodium falciparum antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients". *Am J Trop Med Hyg*, 55 (3): 315-23.
- Figueiredo, R.T., P.L. Fernandez, D.S. Mourao-Sa, B.N. Porto, F.F. Dutra, L.S. Alves, M.F. Oliveira, P.L. Oliveira, A.V. Graca-Souza et M.T. Bozza. 2007. "Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4". *J Biol Chem*, 282 (28): 20221-9.
- Fillet, G., Y. Beguin et L. Baldelli. 1989. "Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation". *Blood*, 74 (2): 844-51.
- Fillet, G., J.D. Cook et C.A. Finch. 1974. "Storage iron kinetics. VII. A biologic model for reticuloendothelial iron transport". *J Clin Invest*, 53 (6): 1527-33.
- Foey, A.D., S.L. Parry, L.M. Williams, M. Feldmann, B.M. Foxwell et F.M. Brennan. 1998. "Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases". *J Immunol*, 160 (2): 920-8.
- Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr et A.Y. Rudensky. 2005. "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny". *J Exp Med*, 202 (7): 901-6.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin et A.Y. Rudensky. 2003. "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells". *Nat Immunol*, 4 (4): 330-6.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin et A.Y. Rudensky. 2005. "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells". *Nat Immunol*, 6 (11): 1142-51.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr et A.Y. Rudensky. 2005. "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3". *Immunity*, 22 (3): 329-41.
- Francis, S.E., D.J. Sullivan, Jr. et D.E. Goldberg. 1997. "Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum". *Annu Rev Microbiol*, 51: 97-123.
- Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood et T. Honjo. 2000. "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation". *J Exp Med*, 192 (7): 1027-34.



- Gadsby, N.J. 2008. "A Genetic Analysis of Two Strains of *Plasmodium chabaudi adami* that Differ in Growth and Pathogenicity". *Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy* The University of Edinburgh: 219.
- Galbraith, R. 1999. "Heme oxygenase: who needs it?" *Proc Soc Exp Biol Med*, 222 (3): 299-305.
- Garcia, I., Y. Miyazaki, K. Araki, M. Araki, R. Lucas, G.E. Grau, G. Milon, Y. Belkaid, C. Montixi, W. Lesslauer et al. 1995. "Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections". *Eur J Immunol*, 25 (8): 2401-7.
- Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait et R.I. Lechler. 2007. "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells". *Blood*, 109 (5): 2058-65.
- Garnham, P.C. 1970. "The role of the spleen in protozoal infections with special reference to splenectomy". *Acta Trop*, 27 (1): 1-14.
- Gatidis, S., M. Foller et F. Lang. 2009. "Hemin-induced suicidal erythrocyte death". *Ann Hematol*, 88 (8): 721-6.
- Gavin, M.A., S.R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos et A. Rudensky. 2002. "Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo". *Nat Immunol*, 3 (1): 33-41.
- Gazzinelli, R.T. 1996. "Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases". *Mol Med Today*, 2 (6): 258-67.
- Gazzinelli, R.T. et E.Y. Denkers. 2006. "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism". *Nat Rev Immunol*, 6 (12): 895-906.
- Gems, C., C.H. Woo, H.H. Fudenberg et R. Schmid. 1973. "Erythrocyte catabolism by macrophages in vitro. The effect of hydrocortisone on erythrophagocytosis and on the induction of heme oxygenase". *J Clin Invest*, 52 (4): 812-22.
- Gerber, J.S. et D.M. Mosser. 2001. "Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors". *J Immunol*, 166 (11): 6861-8.
- Gill, F.A., D. Kaye et E.W. Hook. 1966. "The influence of erythrophagocytosis on the interaction of macrophages and salmonella in vitro". *J Exp Med*, 124 (2): 173-83.
- Gloire, G., S. Legrand-Poels et J. Piette. 2006. "NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later". *Biochem Pharmacol*, 72 (11): 1493-505.
- Goldsby, R., T. Kindt, B. Osborne et J. Kuby (2003). *Immunology*. New York, W.H. Freeman and Company.

- Goldstein, L., Z.P. Teng, E. Zeserson, M. Patel et R.F. Regan. 2003. "Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells". *J Neurosci Res*, 73 (1): 113-21.
- Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi et R.J. Noelle. 2005. "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism". *J Immunol*, 174 (4): 1783-6.
- Gonzalez-Michaca, L., G. Farrugia, A.J. Croatt, J. Alam et K.A. Nath. 2004. "Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells". *Am J Physiol Renal Physiol*, 286 (2): F370-7.
- Gordeuk, V., P. Thuma, G. Brittenham, C. McLaren, D. Parry, A. Backenstose, G. Biemba, R. Msiska, L. Holmes, E. McKinley et et al. 1992. "Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria". *N Engl J Med*, 327 (21): 1473-7.
- Gordeuk, V.R., P.E. Thuma, G.M. Brittenham, S. Zulu, G. Simwanza, A. Mhangu, G. Flesch et D. Parry. 1992. "Iron chelation with desferrioxamine B in adults with asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia". *Blood*, 79 (2): 308-12.
- Gordon, S. 2003. "Alternative activation of macrophages". *Nat Rev Immunol*, 3 (1): 23-35.
- Goriely, S., C. Molle, M. Nguyen, V. Albarani, N.O. Haddou, R. Lin, D. De Wit, V. Flamand, F. Willems et M. Goldman. 2006. "Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation". *Blood*, 107 (3): 1078-84.
- Graca-Souza, A.V., M.A. Arruda, M.S. de Freitas, C. Barja-Fidalgo et P.L. Oliveira. 2002. "Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes". *Blood*, 99 (11): 4160-5.
- Grau, G.E., L.F. Fajardo, P.F. Piguet, B. Allet, P.H. Lambert et P. Vassalli. 1987. "Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria". *Science*, 237 (4819): 1210-2.
- Grau, G.E., T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel et P.H. Lambert. 1989. "Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria". *N Engl J Med*, 320 (24): 1586-91.
- Green, E.A., L. Gorelik, C.M. McGregor, E.H. Tran et R.A. Flavell. 2003. "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (19): 10878-83.
- Greenwood, B. et T. Mutabingwa. 2002. "Malaria in 2002". *Nature*, 415 (6872): 670-2.
- Greenwood, B.M. 1974. "Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis". *Lancet*, 1 (7855): 435-6.



- Greenwood, B.M., J.H. Playfair et G. Torrigiani. 1971. "Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics". *Clin Exp Immunol*, 8 (3): 467-78.
- Greer, J.P., J. Foerster, G.M. Rodgers, F. Paraskevas, B. Glader, D.A. Arber et R.T. Means, Jr. 2008. "Wintrobe's Clinical Hematology ( Twelfth Edition)". *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.*, 1: 272.
- Gupta, S., A.V. Hill, D. Kwiatkowski, A.M. Greenwood, B.M. Greenwood et K.P. Day. 1994. "Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (9): 3715-9.
- Gutteridge, J.M. 1986. "Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides". *FEBS Lett*, 201 (2): 291-5.
- Hacker, G., S. Kirschnek et S.F. Fischer. 2006. "Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus". *Med Microbiol Immunol*, 195 (1): 11-9.
- Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G.B. Lipford et H. Wagner. 1998. "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation". *Embo J*, 17 (21): 6230-40.
- Hafalla, J.C., I.A. Cockburn et F. Zavala. 2006. "Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection". *Parasite Immunol*, 28 (1-2): 15-24.
- Haidaris, C.G., J.D. Haynes, M.S. Meltzer et A.C. Allison. 1983. "Serum containing tumor necrosis factor is cytotoxic for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*". *Infect Immun*, 42 (1): 385-93.
- Halder, K., S.C. Murphy, D.A. Milner et T.E. Taylor. 2007. "Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease". *Annu Rev Pathol*, 2: 217-49.
- Han, C., M.U. Rahman, M.K. Doyle, J.M. Bathon, J. Smolen, A. Kavanaugh, R. Westhovens, E.W. St Clair, D. Baker et M. Bala. 2007. "Association of anemia and physical disability among patients with rheumatoid arthritis". *J Rheumatol*, 34 (11): 2177-82.
- Hand, W.L. et N.L. King-Thompson. 1983. "Effect of erythrocyte ingestion on macrophage antibacterial function". *Infect Immun*, 40 (3): 917-23.
- Hansen, D.S. et L. Schofield. 2010. "Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?" *PLoS Pathog*, 6 (4): e1000771.
- Hawrylowicz, C.M. et A. O'Garra. 2005. "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma". *Nat Rev Immunol*, 5 (4): 271-83.

Hayashi, S., R. Takamiya, T. Yamaguchi, K. Matsumoto, S.J. Tojo, T. Tamatani, M. Kitajima, N. Makino, Y. Ishimura et M. Suematsu. 1999. "Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme". *Circ Res*, 85 (8): 663-71.

Hayashi, T., Y. Ueno et T. Okamoto. 1993. "Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin". *J Biol Chem*, 268 (15): 11380-8.

Hearn, J., N. Rayment, D.N. Landon, D.R. Katz et J.B. de Souza. 2000. "Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature". *Infect Immun*, 68 (9): 5364-76.

Hebbel, R.P. 1991. "Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology". *Blood*, 77 (2): 214-37.

Hebbel, R.P. et J.W. Eaton. 1989. "Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane". *Semin Hematol*, 26 (2): 136-49.

Hegazi, R.A., K.N. Rao, A. Mayle, A.R. Sepulveda, L.E. Otterbein et S.E. Plevy. 2005. "Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway". *J Exp Med*, 202 (12): 1703-13.

Hejna, J.M., N.J. Rencricca et R.M. Coleman. 1974. "Effective recovery and immunity to virulent malaria following red cell transfusion at crisis". *Proc Soc Exp Biol Med*, 146 (2): 462-4.

Helmby, H., G. Jonsson et M. Troye-Blomberg. 2000. "Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* chabaudi AS". *Infect Immun*, 68 (3): 1485-90.

Hempelmann, E. 2007. "Hemozoin Biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors". *Parasitol Res*, 100 (4): 671-6.

Herman, A.E., G.J. Freeman, D. Mathis et C. Benoist. 2004. "CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion". *J Exp Med*, 199 (11): 1479-89.

Hernandez-Valladares, M., J. Naessens et F.A. Iraqi. 2005. "Genetic resistance to malaria in mouse models". *Trends Parasitol*, 21 (8): 352-5.

Hesse, M., C.A. Piccirillo, Y. Belkaid, J. Prifer, M. Mentink-Kane, M. Leusink, A.W. Cheever, E.M. Shevach et T.A. Wynn. 2004. "The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells". *J Immunol*, 172 (5): 3157-66.

- Hirunpetcharat, C. et M.F. Good. 1998. "Deletion of *Plasmodium berghei*-specific CD4+ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (4): 1715-20.
- Hisaeda, H., Y. Maekawa, D. Iwakawa, H. Okada, K. Himeno, K. Kishihara, S. Tsukumo et K. Yasutomo. 2004. "Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells". *Nat Med*, 10 (1): 29-30.
- Hoentjen, F., R.B. Sartor, M. Ozaki et C. Jobin. 2005. "STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells". *Blood*, 105 (2): 689-96.
- Hoffman, I.F., C.S. Jere, T.E. Taylor, P. Munthali, J.R. Dyer, J.J. Wirima, S.J. Rogerson, N. Kumwenda, J.J. Eron, S.A. Fiscus, H. Chakraborty, T.E. Taha, M.S. Cohen et M.E. Molyneux. 1999. "The effect of *Plasmodium falciparum* malaria on HIV-1 RNA blood plasma concentration". *Aids*, 13 (4): 487-94.
- Hoffman, S.L., J.M. Crutcher, S.K. Puri, A.A. Ansari, F. Villinger, E.D. Franke, P.P. Singh, F. Finkelman, M.K. Gately, G.P. Dutta et M. Sedegah. 1997. "Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12". *Nat Med*, 3 (1): 80-3.
- Hoffman, S.L., R. Wistar, Jr., W.R. Ballou, M.R. Hollingdale, R.A. Wirtz, I. Schneider, H.A. Marwoto et W.T. Hockmeyer. 1986. "Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*". *N Engl J Med*, 315 (10): 601-6.
- Holm, T.L., J. Nielsen et M.H. Claesson. 2004. "CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology". *Apmis*, 112 (10): 629-41.
- Holt, S. et K. Moore. 2000. "Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin". *Exp Nephrol*, 8 (2): 72-6.
- Hori, S., T. Nomura et S. Sakaguchi. 2003. "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3". *Science*, 299 (5609): 1057-61.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra et K.M. Murphy. 1993. "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages". *Science*, 260 (5107): 547-9.
- Hu, X., P.K. Paik, J. Chen, A. Yamilina, L. Kockeritz, T.T. Lu, J.R. Woodgett et L.B. Ivashkiv. 2006. "IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins". *Immunity*, 24 (5): 563-74.
- Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake et D.A. Vignali. 2004. "Role of LAG-3 in regulatory T cells". *Immunity*, 21 (4): 503-13.

- Huang, F.P., G. Xi, R.F. Keep, Y. Hua, A. Nemoianu et J.T. Hoff. 2002. "Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products". *J Neurosurg*, 96 (2): 287-93.
- Huffman, L.J., P.R. Miles, X. Shi et L. Bowman. 2000. "Hemoglobin potentiates the production of reactive oxygen species by alveolar macrophages". *Exp Lung Res*, 26 (3): 203-17.
- Hunt, N.H. et R. Stocker. 1990. "Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes". *Blood Cells*, 16 (2-3): 499-526; discussion 527-30.
- Isaac-Renton, J.L., A.L. Koon, R.M. Chan, A.W. Chow et S.L. Sacks. 1983. "Drug resistance in malaria: three cases and a review". *Can Med Assoc J*, 129 (5): 454-7.
- Ishikawa-Sekigami, T., Y. Kaneko, H. Okazawa, T. Tomizawa, J. Okajo, Y. Saito, C. Okuzawa, M. Sugawara-Yokoo, U. Nishiyama, H. Ohnishi, T. Matozaki et Y. Nojima. 2006. "SHPS-I promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages". *Blood*, 107 (1): 341-8.
- Isler, P., B.G. de Rochemonteix, F. Songeon, N. Boehringer et L.P. Nicod. 1999. "Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10". *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20 (2): 270-8.
- Jacobs, P., D. Radzioch et M.M. Stevenson. 1996. "In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice". *Infect Immun*, 64 (1): 44-9.
- Jacobs, P., D. Radzioch et M.M. Stevenson. 1996. "A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice". *Infect Immun*, 64 (2): 535-41.
- Jacobs, T., S.E. Graefe, S. Niknafs, I. Gaworski et B. Fleischer. 2002. "Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade". *J Immunol*, 169 (5): 2323-9.
- Jacobs, T., T. Plate, I. Gaworski et B. Fleischer. 2004. "CTLA-4-dependent mechanisms prevent T cell induced-liver pathology during the erythrocyte stage of Plasmodium berghei malaria". *Eur J Immunol*, 34 (4): 972-80.
- Jacobsen, F.W., O.P. Veiby, T. Stokke et S.E. Jacobsen. 1996. "TNF-alpha bidirectionally modulates the viability of primitive murine hematopoietic progenitor cells in vitro". *J Immunol*, 157 (3): 1193-9.
- Jakeman, G.N., A. Saul, W.L. Hogarth et W.E. Collins. 1999. "Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes". *Parasitology*, 119 ( Pt 2): 127-33.

- Jakobsen, P.H., C.A. Bate, J. Taverne et J.H. Playfair. 1995. "Malaria: toxins, cytokines and disease". *Parasite Immunol*, 17 (5): 223-31.
- James, E.R. et D.R. Green. 2004. "Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction". *Trends Parasitol*, 20 (6): 280-7.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport et M.J. Shlomchik. 2001. "Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, Fifth Edition". *Garland Publishing*.
- Jangpatarapongsa, K., J. Sirichaisinthop, J. Sattabongkot, L. Cui, S.M. Montgomery, S. Looareesuwan, M. Troye-Blomberg et R. Udomsangpetch. 2006. "Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection". *Microbes Infect*, 8 (3): 680-6.
- Janjua, R.M., R. Schultka, L. Goebbel, T.G. Pait et C.B. Shields. 2010. "The legacy of Johann Friedrich Meckel the Elder (1724-1774): a 4-generation dynasty of anatomists". *Neurosurgery*, 66 (4): 758-70; discussion 770-1.
- Jaramillo, M., M.J. Bellemare, C. Martel, M.T. Shio, A.P. Contreras, M. Godbout, M. Roger, E. Gaudreault, J. Gosselin, D.S. Bohle et M. Olivier. 2009. "Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: a morphology - function study". *PLoS One*, 4 (9): e6957.
- Jaramillo, M., M. Godbout et M. Olivier. 2005. "Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms". *J Immunol*, 174 (1): 475-84.
- Jaramillo, M., D.C. Gowda, D. Radzioch et M. Olivier. 2003. "Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways". *J Immunol*, 171 (8): 4243-53.
- Jaramillo, M., I. Plante, N. Ouellet, K. Vandal, P.A. Tessier et M. Olivier. 2004. "Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection". *J Immunol*, 172 (5): 3101-10.
- Jeney, V., J. Balla, A. Yachie, Z. Varga, G.M. Vercellotti, J.W. Eaton et G. Balla. 2002. "Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme". *Blood*, 100 (3): 879-87.
- Jiang, H.L., M.L. Kang, J.S. Quan, S.G. Kang, T. Akaike, H.S. Yoo et C.S. Cho. 2008. "The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization". *Biomaterials*, 29 (12): 1931-9.
- John, C.C., A.M. Moormann, P.O. Sumba, A.V. Ofulla, D.C. Pregibon et J.W. Kazura. 2004. "Gamma interferon responses to *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen 1 and thrombospondin-related adhesive protein and their relationship to age, transmission intensity, and protection against malaria". *Infect Immun*, 72 (9): 5135-42.

- John, C.C., R.A. O'Donnell, P.O. Sumba, A.M. Moormann, T.F. de Koning-Ward, C.L. King, J.W. Kazura et B.S. Crabb. 2004. "Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area of Africa". *J Immunol*, 173 (1): 666-72.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop et A.H. Enk. 2001. "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood". *J Exp Med*, 193 (11): 1285-94.
- Kamen, L.A., J. Levinsohn, A. Cadwallader, S. Tridandapani et J.A. Swanson. 2008. "SHIP-1 increases early oxidative burst and regulates phagosome maturation in macrophages". *J Immunol*, 180 (11): 7497-505.
- Kang, B.Y., E. Kim et T.S. Kim. 2005. "Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells". *Cell Signal*, 17 (6): 665-73.
- Kaye, D. et E.W. Hook. 1963. "The Influence of Hemolysis on Susceptibility to Salmonella Infection: Additional Observations". *J Immunol*, 91: 518-27.
- Kehrer, J.P. 2000. "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity". *Toxicology*, 149 (1): 43-50.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman et A.H. Sharpe. 2008. "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity". *Annu Rev Immunol*, 26: 677-704.
- Keller, C.C., O. Yamo, C. Ouma, J.M. Ong'echa, D. Ounah, J.B. Hittner, J.M. Vulule et D.J. Perkins. 2006. "Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia". *Infect Immun*, 74 (9): 5249-60.
- Kemp, K., B.D. Akanmori, V. Adabayeri, B.Q. Goka, J.A. Kurtzhals, C. Behr et L. Hviid. 2002. "Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for *Plasmodium falciparum* malaria". *Clin Exp Immunol*, 127 (1): 151-7.
- Khatib, R., R. Rabah et S.A. Sarnaik. 2009. "The spleen in the sickling disorders: an update". *Pediatr Radiol*, 39 (1): 17-22.
- Khattari, R., T. Cox, S.A. Yasayko et F. Ramsdell. 2003. "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells". *Nat Immunol*, 4 (4): 337-42.
- Kiefer, C.R. et L.M. Snyder. 2000. "Oxidation and erythrocyte senescence". *Curr Opin Hematol*, 7 (2): 113-6.
- Killick-Kendrick, R. et W. Peters. 1978. "Rodent malaria". *Academic Press*, London.

- Kim, J.S., H.Y. Kwon, W.H. Choi, C.Y. Jeon, J.I. Kim, J. Kim, J.Y. Lee, Y.S. Kim et J.B. Park. 2003. "Phagocytosis of serum- and IgG-opsonized zymosan particles induces apoptosis through superoxide but not nitric oxide in macrophage J774A.1". *Exp Mol Med*, 35 (3): 211-21.
- Kim, K.J., F.I. Weinbaum et R. Asofsky. 1978. "Functional characteristics of BALB/c T cell lines: suppression in the mixed lymphocyte response and cell-mediated lysis". *J Immunol*, 121 (6): 2299-304.
- Knutson, M.D., M.R. Vafa, D.J. Haile et M. Wessling-Resnick. 2003. "Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages". *Blood*, 102 (12): 4191-7.
- Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia et G. Trinchieri. 1989. "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes". *J Exp Med*, 170 (3): 827-45.
- Kohen, R. et A. Nyska. 2002. "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification". *Toxicol Pathol*, 30 (6): 620-50.
- Komatsu, H., A. Hoshino, M. Funayama, K. Kawahara et F. Obata. 2003. "Oxidative modulation of the glutathione-redox couple enhances lipopolysaccharide-induced interleukin 12 P40 production by a mouse macrophage cell line, J774A.1". *Free Radic Res*, 37 (3): 293-9.
- Kondo, H., K. Saito, J.P. Grasso et P. Aisen. 1988. "Iron metabolism in the erythrophagocytosing Kupffer cell". *Hepatology*, 8 (1): 32-8.
- Kontoyiannis, D., A. Kotlyarov, E. Carballo, L. Alexopoulou, P.J. Blackshear, M. Gaestel, R. Davis, R. Flavell et G. Kollias. 2001. "Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology". *Embo J*, 20 (14): 3760-70.
- Kossodo, S., C. Monso, P. Juillard, T. Velu, M. Goldman et G.E. Grau. 1997. "Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria". *Immunology*, 91 (4): 536-40.
- Kremer, M.L. 1989. "The reaction of hemin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>". *Eur J Biochem*, 185 (3): 651-8.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig et H. von Boehmer. 2005. "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen". *Nat Immunol*, 6 (12): 1219-27.
- Krishnegowda, G., A.M. Hajjar, J. Zhu, E.J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A.S. Woods et D.C. Gowda. 2005. "Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors,



glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity". *J Biol Chem*, 280 (9): 8606-16.

Kubulus, D., A. Mathes, S. Pradarutti, A. Raddatz, J. Heiser, D. Pavlidis, B. Wolf, I. Bauer et H. Rensing. 2008. "Hemin arginate-induced heme oxygenase 1 expression improves liver microcirculation and mediates an anti-inflammatory cytokine response after hemorrhagic shock". *Shock*, 29 (5): 583-90.

Kullberg, M.C., D. Jankovic, P.L. Gorelick, P. Caspar, J.J. Letterio, A.W. Cheever et A. Sher. 2002. "Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis". *J Exp Med*, 196 (4): 505-15.

Kumar, S. et U. Bandyopadhyay. 2005. "Free heme toxicity and its detoxification systems in human". *Toxicol Lett*, 157 (3): 175-88.

Kumar, S., L.H. Miller, I.A. Quakyi, D.B. Keister, R.A. Houghten, W.L. Maloy, B. Moss, J.A. Berzofsky et M.F. Good. 1988. "Cytotoxic T cells specific for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*". *Nature*, 334 (6179): 258-60.

Kumaratilake, L.M. et A. Ferrante. 2000. "Opsonization and phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites measured by flow cytometry". *Clin Diagn Lab Immunol*, 7 (1): 9-13.

Kumaratilake, L.M., A. Ferrante, T. Jaeger et S.D. Morris-Jones. 1997. "The role of complement, antibody, and tumor necrosis factor alpha in the killing of *Plasmodium falciparum* by the monocytic cell line THP-1". *Infect Immun*, 65 (12): 5342-5.

Kumaratilake, L.M., A. Ferrante, T. Jaeger et C.M. Rzepczyk. 1992. "Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *Plasmodium falciparum* merozoites". *Infect Immun*, 60 (9): 3731-8.

Kurtzhals, J.A., V. Adabayeri, B.Q. Goka, B.D. Akanmori, J.O. Oliver-Commey, F.K. Nkrumah, C. Behr et L. Hviid. 1998. "Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria". *Lancet*, 351 (9118): 1768-72.

Kurz, T., B. Gustafsson et U.T. Brunk. 2006. "Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage". *Febs J*, 273 (13): 3106-17.

Kuvibidila, S., R. Gardner, D. Ode, L. Yu, G. Lane et R.P. Warrier. 1997. "Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition". *J Natl Med Assoc*, 89 (9): 609-15.

Kwiatkowski, D. 1993. "TNF-inducing malaria toxin: a sheep in wolf's clothing?" *Ann Trop Med Parasitol*, 87 (6): 613-6.

Kwiatkowski, D., A.V. Hill, I. Sambou, P. Twumasi, J. Castracane, K.R. Manogue, A. Cerami, D.R. Brewster et B.M. Greenwood. 1990. "TNF concentration in fatal cerebral, non-



fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria". *Lancet*, 336 (8725): 1201-4.

Lakkisto, P., C. Csonka, G. Fodor, P. Bencsik, L.M. Voipio-Pulkki, P. Ferdinandy et K. Pulkki. 2009. "The heme oxygenase inducer hemin protects against cardiac dysfunction and ventricular fibrillation in ischaemic/reperfused rat hearts: role of connexin 43". *Scand J Clin Lab Invest*, 69 (2): 209-18.

Lali, F.V., A.E. Hunt, S.J. Turner et B.M. Foxwell. 2000. "The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase". *J Biol Chem*, 275 (10): 7395-402.

Lamikanra, A.A., D. Brown, A. Potocnik, C. Casals-Pascual, J. Langhorne et D.J. Roberts. 2007. "Malarial anemia: of mice and men". *Blood*, 110 (1): 18-28.

Landau, I. et Y. Boulard. 1978. "Life Cycles and morphology. In: Killick-Kendrick, R., Peters W., (Eds), Rodent Malaria." *Academic Press*: 53-84.

Lang, D., S. Reuter, T. Buzescu, C. August et S. Heidenreich. 2005. "Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation". *Int Immunol*, 17 (2): 155-65.

Langhorne, J., C. Cross, E. Seixas, C. Li et T. von der Weid. 1998. "A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice". *Proc Natl Acad Sci US A*, 95 (4): 1730-4.

Laurence, A., C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R.B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E.M. Shevach et J. O'Shea J. 2007. "Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation". *Immunity*, 26 (3): 371-81.

Laveran, C.L. 1982. "Classics in infectious diseases: A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria: Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922)". *Rev Infect Dis*, 4 (4): 908-11.

Lee, J.C., S. Kassis, S. Kumar, A. Badger et J.L. Adams. 1999. "p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials". *Pharmacol Ther*, 82 (2-3): 389-97.

Lee, T.S. et L.Y. Chau. 2002. "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice". *Nat Med*, 8 (3): 240-6.

Lenardo, M., K.M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang et L. Zheng. 1999. "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment". *Annu Rev Immunol*, 17: 221-53.

- Lepenius, B., I. Gaworski, S. Tartz, J. Langhorne, B. Fleischer et T. Jacobs. 2007. "CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections". *Microbes Infect*, 9 (6): 687-94.
- Levesque, M.A., A.D. Sullivan et S.R. Meshnick. 1999. "Splenic and hepatic hemozoin in mice after malaria parasite clearance". *J Parasitol*, 85 (3): 570-3.
- Levings, M.K., R. Sangregorio et M.G. Roncarolo. 2001. "Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function". *J Exp Med*, 193 (11): 1295-302.
- Lezcano, N.E., N. Odo, A. Kutlar, D. Brambilla et R.J. Adams. 2006. "Regular transfusion lowers plasma free hemoglobin in children with sickle-cell disease at risk for stroke". *Stroke*, 37 (6): 1424-6.
- Li, C., L.A. Sanni, F. Omer, E. Riley et J. Langhorne. 2003. "Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies". *Infect Immun*, 71 (9): 4850-6.
- Li, C., E. Seixas et J. Langhorne. 2001. "Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite". *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 189 (3): 115-26.
- Lim, H.W., P. Hillsamer, A.H. Banham et C.H. Kim. 2005. "Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells". *J Immunol*, 175 (7): 4180-3.
- Linke, A., R. Kuhn, W. Muller, N. Honarvar, C. Li et J. Langhorne. 1996. "*Plasmodium chabaudi chabaudi*: differential susceptibility of gene-targeted mice deficient in IL-10 to an erythrocytic-stage infection". *Exp Parasitol*, 84 (2): 253-63.
- Liu, J., S. Cao, L.M. Herman et X. Ma. 2003. "Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1". *J Exp Med*, 198 (8): 1265-76.
- Loefering, D.J., L.M. Commins, F.L. Minnear, L.A. Gary et L.A. Hill. 1987. "Effect of Kupffer cell phagocytosis of erythrocytes and erythrocyte ghosts on susceptibility to endotoxemia and bacteremia". *Infect Immun*, 55 (9): 2074-80.
- Loefering, D.J., G.J. Grover et M.J. Schneidkraut. 1984. "Effect of red blood cells and red blood cell ghosts on reticuloendothelial system function". *Exp Mol Pathol*, 41 (1): 67-73.
- Loefering, D.J., M.J. Raley, T.A. Reho et J.W. Eaton. 1996. "Macrophage dysfunction following the phagocytosis of IgG-coated erythrocytes: production of lipid peroxidation products". *J Leukoc Biol*, 59 (3): 357-62.

- Long, T.T., S. Nakazawa, S. Onizuka, M.C. Huaman et H. Kanbara. 2003. "Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice". *Int J Parasitol*, 33 (2): 175-83.
- Loose, L.D. 1984. "Characterization of macrophage dysfunction in rodent malaria". *J Leukoc Biol*, 36 (6): 703-18.
- Loose, L.D., J.A. Cook et N.R. Di Luzio. 1972. "Malaria immunosuppression – a macrophage-mediated defect". *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 39: 484-491.
- Lu, H.T., D.D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R.J. Davis et R.A. Flavell. 1999. "Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice". *Embo J*, 18 (7): 1845-57.
- Luan, J., B. Zhou, H. Ding et Z. Qi. 2007. "Tolerance of mice to lipopolysaccharide is correlated with inhibition of caspase-3-mediated apoptosis in mouse liver cells". *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39 (2): 96-100.
- Luder, C.G. et U. Gross. 2005. "Apoptosis and its modulation during infection with Toxoplasma gondii: molecular mechanisms and role in pathogenesis". *Curr Top Microbiol Immunol*, 289: 219-37.
- Luder, C.G., U. Gross et M.F. Lopes. 2001. "Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions". *Trends Parasitol*, 17 (10): 480-6.
- Luo, Q., X. Ma, S.M. Wahl, J.J. Bieker, M. Crossley et L.J. Montaner. 2004. "Activation and repression of interleukin-12 p40 transcription by erythroid Kruppel-like factor in macrophages". *J Biol Chem*, 279 (18): 18451-6.
- Luty, A.J., B. Lell, R. Schmidt-Ott, L.G. Lehman, D. Luckner, B. Greve, P. Matousek, K. Herbich, D. Schmid, F. Migot-Nabias, P. Deloron, R.S. Nussenzweig et P.G. Kremsner. 1999. "Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children". *J Infect Dis*, 179 (4): 980-8.
- Luty, A.J., D.J. Perkins, B. Lell, R. Schmidt-Ott, L.G. Lehman, D. Luckner, B. Greve, P. Matousek, K. Herbich, D. Schmid, J.B. Weinberg et P.G. Kremsner. 2000. "Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria". *Infect Immun*, 68 (7): 3909-15.
- Lutz, H.U., S. Fasler, P. Stammer, F. Bussolino et P. Arese. 1988. "Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement in phagocytosis of oxidatively-stressed and in clearance of senescent red cells". *Blood Cells*, 14 (1): 175-203.
- Lutz, H.U., M. Pfister et R. Hornig. 1996. "Tissue homeostatic role of naturally occurring anti-band 3 antibodies". *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 42 (7): 995-1005.

- Luyendyk, J., O.R. Olivas, L.A. Ginger et A.C. Avery (2002). Antigen-presenting cell function during *Plasmodium yoelii* infection. *Infect Immun*. **70**: 2941-9.
- Lyke, K.E., R. Burges, Y. Cissoko, L. Sangare, M. Dao, I. Diarra, A. Kone, R. Harley, C.V. Plowe, O.K. Doumbo et M.B. Szein. 2004. "Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls". *Infect Immun*, 72 (10): 5630-7.
- Lytton, S.D., M. Loyevsky, B. Mester, J. Libman, I. Landau, A. Shänzer et Z.I. Cabantchik. 1993. "In vivo antimalarial action of a lipophilic iron (III) chelator: suppression of *Plasmodium vinckei* infection by reversed siderophore". *Am J Hematol*, 43 (3): 217-20.
- Ma, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N.E. Miller, M. Hukkanen, G.F. Ma et Y.T. Kontinen. 2003. "Regulation of macrophage activation". *Cell Mol Life Sci*, 60 (11): 2334-46.
- Ma, J.L., P.Y. Yang, Y.C. Rui, L. Lu, H. Kang et J. Zhang. 2007. "Hemin modulates cytokine expressions in macrophage-derived foam cells via heme oxygenase-1 induction". *J Pharmacol Sci*, 103 (3): 261-6.
- Ma, W., W. Lim, K. Gee, S. Aucoin, D. Nandan, M. Kozlowski, F. Diaz-Mitoma et A. Kumar. 2001. "The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages". *J Biol Chem*, 276 (17): 13664-74.
- Ma, X., J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo et G. Trinchieri. 1996. "The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells". *J Exp Med*, 183 (1): 147-57.
- Mabey, D.C., A. Brown et B.M. Greenwood. 1987. "*Plasmodium falciparum* malaria and *Salmonella* infections in Gambian children". *J Infect Dis*, 155 (6): 1319-21.
- MacCallum, D.K. 1969. "Time sequence study on the hepatic system of macrophages in malaria-infected hamsters". *J Reticuloendothel Soc*, 6 (3): 232-52.
- Mahajan, R.C., N.K. Ganguly, M. Thadani et R.N. Prasad. 1986. "Immunosuppression in murine malaria: role of activated macrophages". *Aust J Exp Biol Med Sci*, 64 ( Pt 1): 63-6.
- Maines, M.D. 1997. "The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 517-54.
- Malaguarnera, L., S. Pignatelli, M. Musumeci, J. Simpoire et S. Musumeci. 2002. "Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria". *Parasite Immunol*, 24 (9-10): 489-92.

- Malaguarnera, L., S. Pignatelli, J. Simpo, M. Malaguarnera et S. Musumeci. 2002. "Plasma levels of interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in Plasmodium falciparum malaria". *Eur Cytokine Netw*, 13 (4): 425-30.
- Malek, T.R. et A.L. Bayer. 2004. "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2". *Nat. Rev. Immunol*, 4 (665-674).
- Malik, A., J.E. Egan, R.A. Houghten, J.C. Sadoff et S.L. Hoffman. 1991. "Human cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (8): 3300-4.
- Maloy, K.J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N.J. Saunders et F. Powrie. 2003. "CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms". *J Exp Med*, 197 (1): 111-9.
- Mandal, D., P.K. Moitra, S. Saha et J. Basu. 2002. "Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes". *FEBS Lett*, 513 (2-3): 184-8.
- Marriott, J.B., I.A. Clarke et A.G. Dalgleish. 2001. "Inhibition of p38 MAP kinase during cellular activation results in IFN-gamma-dependent augmentation of IL-12 production by human monocytes/macrophages". *Clin Exp Immunol*, 125 (1): 64-70.
- Martin, M., R.E. Schifferle, N. Cuesta, S.N. Vogel, J. Katz et S.M. Michalek. 2003. "Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide". *J Immunol*, 171 (2): 717-25.
- Matthews, J.R., N. Wakasugi, J.L. Virelizier, J. Yodoi et R.T. Hay. 1992. "Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62". *Nucleic Acids Res*, 20 (15): 3821-30.
- Mazzeo, D., S. Sacco, P. Di Lucia, G. Penna, L. Adorini, P. Panina-Bordignon et P. Ghezzi. 2002. "Thiol antioxidants inhibit the formation of the interleukin-12 heterodimer: a novel mechanism for the inhibition of IL-12 production". *Cytokine*, 17 (6): 285-93.
- McCutchan, T.F., M.F. Good et L.H. Miller. 1989. "Polymorphism in the circumsporozoite (CS) protein of Plasmodium falciparum". *Parasitol Today*, 5 (5): 143-6.
- McGilvray, I.D., L. Serghides, A. Kapus, O.D. Rotstein et K.C. Kain. 2000. "Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance". *Blood*, 96 (9): 3231-40.
- McGuire, W., U. D'Alessandro, S. Stephens, B.O. Olaleye, P. Langerock, B.M. Greenwood et D. Kwiatkowski. 1998. "Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92 (1): 50-3.

- McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins et M.C. Byrne. 2002. "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor". *Immunity*, 16 (2): 311-23.
- McKee, A.S. et E.J. Pearce. 2004. "CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development". *J Immunol*, 173 (2): 1224-31.
- McKinstry, K.K., T.M. Strutt et S.L. Swain. 2010. "Regulation of CD4+ T-cell contraction during pathogen challenge". *Immunol Rev*, 236: 110-24.
- Means, R.T., Jr. et S.B. Krantz. 1992. "Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease". *Blood*, 80 (7): 1639-47.
- Mebius, R.E. et G. Kraal. 2005. "Structure and function of the spleen". *Nat Rev Immunol*, 5 (8): 606-16.
- Meckel, H. 1847. "Ueber schwarzes Pigment in der Milz und dem Blute einer Geisteskranken". *Zeitschr f Psychiatrie*, 4: 196-226.
- Mestas, J. et C.C. Hughes. 2004. "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology". *J Immunol*, 172 (5): 2731-8.
- Miller, L.H., D.I. Baruch, K. Marsh et O.K. Doumbo. 2002. "The pathogenic basis of malaria". *Nature*, 415 (6872): 673-9.
- Miller, L.H., M.F. Good et G. Milon. 1994. "Malaria pathogenesis". *Science*, 264 (5167): 1878-83.
- Millington, O.R., C. Di Lorenzo, R.S. Phillips, P. Garside et J.M. Brewer. 2006. "Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function". *J Biol*, 5 (2): 5.
- Mills, K.H. 2004. "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nat Rev Immunol*, 4 (11): 841-55.
- Minigo, G., T. Woodberry, K.A. Piera, E. Salwati, E. Tjitra, E. Kenangalem, R.N. Price, C.R. Engwerda, N.M. Anstey et M. Plebanski. 2009. "Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria". *PLoS Pathog*, 5 (4): e1000402.
- Misra, H.P. et I. Fridovich. 1972. "The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin". *J Biol Chem*, 247 (21): 6960-2.
- Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M.D. Kazatchkine et S.V. Kaveri. 2004. "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells". *J Immunol*, 172 (8): 4676-80.



- Mitchell, A.J., A.M. Hansen, L. Hee, H.J. Ball, S.M. Potter, J.C. Walker et N.H. Hunt. 2005. "Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria". *Infect Immun*, 73 (9): 5645-53.
- Mittendorf, E.A. et P. Sharma. 2010. "Mechanisms of T-cell inhibition: implications for cancer immunotherapy". *Expert Rev Vaccines*, 9 (1): 89-105.
- Mittrucker, H.W. et S.H. Kaufmann. 2004. "Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited". *Eur J Immunol*, 34 (2): 306-12.
- Mohan, K., P. Moulin et M.M. Stevenson. 1997. "Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection". *J Immunol*, 159 (10): 4990-8.
- Mohan, K., H. Sam et M.M. Stevenson. 1999. "Therapy with a combination of low doses of interleukin 12 and chloroquine completely cures blood-stage malaria, prevents severe anemia, and induces immunity to reinfection". *Infect Immun*, 67 (2): 513-9.
- Mohan, K. et M.M. Stevenson. 1998. "Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production". *Br J Haematol*, 103 (4): 942-9.
- Mohan, K. et M.M. Stevenson. 1998. "Interleukin-12 corrects severe anemia during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS in susceptible A/J mice". *Exp Hematol*, 26 (1): 45-52.
- Monette, F.C. et S.A. Holden. 1982. "Hemin enhances the in vitro growth of primitive erythroid progenitor cells". *Blood*, 60 (2): 527-30.
- Moore, L.R., H. Fujioka, P.S. Williams, J.J. Chalmers, B. Grimberg, P.A. Zimmerman et M. Zborowski. 2006. "Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis". *Faseb J*, 20 (6): 747-9.
- Morakote, N. et D.E. Justus. 1988. "Immunosuppression in malaria: effect of hemozoin produced by *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*". *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 86 (1): 28-34.
- Morena, M., J.P. Cristol, L. Senecal, H. Leray-Moragues, D. Krieter et B. Canaud. 2002. "Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit?" *Kidney Int Suppl* (80): 109-14.
- Morse, D., S.E. Pischke, Z. Zhou, R.J. Davis, R.A. Flavell, T. Loop, S.L. Otterbein, L.E. Otterbein et A.M. Choi. 2003. "Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1". *J Biol Chem*, 278 (39): 36993-8.
- Mshana, R.N., S. McLean et J. Boulandi. 1990. "In vitro cell-mediated immune responses to *Plasmodium falciparum* schizont antigens in adults from a malaria endemic area: CD8+ T lymphocytes inhibit the response of low responder individuals". *Int Immunol*, 2 (12): 1121-32.

- Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg et H. Cheroutre. 2007. "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid". *Science*, 317 (5835): 256-60.
- Mukhopadhyay, A., G. Chaudhuri, S.K. Arora, S. Sehgal et S.K. Basu. 1989. "Receptor-mediated drug delivery to macrophages in chemotherapy of leishmaniasis". *Science*, 244 (4905): 705-7.
- Murata, Y., T. Ohteki, S. Koyasu et J. Hamuro. 2002. "IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension". *Eur J Immunol*, 32 (10): 2866-73.
- Murata, Y., T. Shimamura et J. Hamuro. 2002. "The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production". *Int Immunol*, 14 (2): 201-12.
- Nacher, M. 2008. "Worms and malaria: blind men feeling the elephant?" *Parasitology*, 135 (7): 861-8.
- Nagababu, E. et J.M. Rifkind. 2000. "Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin". *Biochem Biophys Res Commun*, 273 (3): 839-45.
- Nagababu, E. et J.M. Rifkind. 2004. "Heme degradation by reactive oxygen species". *Antioxid Redox Signal*, 6 (6): 967-78.
- Nakahira, K., H.P. Kim, X.H. Geng, A. Nakao, X. Wang, N. Murase, P.F. Drain, X. Wang, M. Sasidhar, E.G. Nabel, T. Takahashi, N.W. Lukacs, S.W. Ryter, K. Morita et A.M. Choi. 2006. "Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts". *J Exp Med*, 203 (10): 2377-89.
- Nakamura, H., K. Nakamura et J. Yodoi. 1997. "Redox regulation of cellular activation". *Annu Rev Immunol*, 15: 351-69.
- Nakamura, K., A. Kitani et W. Strober. 2001. "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta". *J Exp Med*, 194 (5): 629-44.
- Nath, K.A., G.M. Vercellotti, J.P. Grande, H. Miyoshi, C.V. Paya, J.C. Manivel, J.J. Haggard, A.J. Croatt, W.D. Payne et J. Alam. 2001. "Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1". *Kidney Int*, 59 (1): 106-17.
- Naumann, H.N., L.W. Diggs, L. Barreras et B.J. Williams. 1971. "Plasma hemoglobin and hemoglobin fractions in sickle cell crisis". *Am J Clin Pathol*, 56 (2): 137-47.
- Navarre, W.W. et A. Zychlinsky. 2000. "Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies". *Cell Microbiol*, 2 (4): 265-73.



- Ndungu, F.M., B.C. Urban, K. Marsh et J. Langhorne. 2005. "Regulation of immune response by Plasmodium-infected red blood cells". *Parasite Immunol*, 27 (10-11): 373-84.
- Newton, C.R., T.T. Hien et N. White. 2000. "Cerebral malaria". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 69 (4): 433-41.
- Nguyen, P.H., N. Day, T.D. Pram, D.J. Ferguson et N.J. White. 1995. "Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89 (2): 200-4.
- Nie, C.Q., N.J. Bernard, L. Schofield et D.S. Hansen. 2007. "CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Suppress CD4+ T-Cell Function and Inhibit the Development of Plasmodium berghei-Specific TH1 Responses Involved in Cerebral Malaria Pathogenesis". *Infect Immun*, 75 (5): 2275-82.
- Niuro, H., T. Otsuka, E. Ogami, K. Yamaoka, S. Nagano, M. Akahoshi, H. Nakashima, Y. Arinobu, K. Izuhara et Y. Niho. 1998. "MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes". *Biochem Biophys Res Commun*, 250 (2): 200-5.
- Nikolaisen, C., Y. Figenschau et J.C. Nossent. 2008. "Anemia in early rheumatoid arthritis is associated with interleukin 6-mediated bone marrow suppression, but has no effect on disease course or mortality". *J Rheumatol*, 35 (3): 380-6.
- Nishizuka, Y. et T. Sakakura. 1969. "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice". *Science*, 166 (906): 753-5.
- Nitcheu, J., O. Bonduelle, C. Combadiere, M. Tefit, D. Seilhean, D. Mazier et B. Combadiere. 2003. "Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis". *J Immunol*, 170 (4): 2221-8.
- Normaznah, Y., A.A. Halim, M. Outhayphone et M.R. Zamri. 1999. "Protective immunity against Plasmodium berghei malaria after administration of interleukin-12". *Malays J Pathol*, 21 (2): 123-5.
- Nti, B.K., J.L. Slingluff, C.C. Keller, J.B. Hittner, J.M. Ong'echa, M. Murphey-Corb et D.J. Perkins. 2005. "Stage-specific effects of Plasmodium falciparum-derived hemozoin on blood mononuclear cell TNF-alpha regulation and viral replication". *Aids*, 19 (16): 1771-80.
- Nussenblatt, V., G. Mukasa, A. Metzger, G. Ndeezi, E. Garrett et R.D. Semba. 2001. "Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated Plasmodium falciparum malaria". *Clin Diagn Lab Immunol*, 8 (6): 1164-70.
- O'Brien, P.J. et C. Little. 1969. "Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. II. Decomposition of a lipid peroxide by subcellular fractions". *Can J Biochem*, 47 (5): 493-9.

- Obi, R.K., C.C. Okangba, F.C. Nwanebu, U.U. Ndubuisi et N.M. Orji. 2010. "Premunition in *Plasmodium falciparum* malaria". *African Journal of Biotechnology*, 9 (10): 1397-1401.
- Ocana-Morgner, C., M.M. Mota et A. Rodriguez. 2003. "Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells". *J Exp Med*, 197 (2): 143-51.
- Ockenhouse, C.F., S. Schulman et H.L. Shear. 1984. "Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by gamma-interferon-activated, monocyte-derived macrophages". *J Immunol*, 133 (3): 1601-8.
- Ockenhouse, C.F. et H.L. Shear. 1984. "Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelii* by activated macrophages". *J Immunol*, 132 (1): 424-31.
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C.M. Cilio et F. Ivars. 2006. "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression". *Immunology*, 118 (2): 240-9.
- Oeuvray, C., M. Theisen, C. Rogier, J.F. Trape, S. Jepsen et P. Druilhe. 2000. "Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal". *Infect Immun*, 68 (5): 2617-20.
- Ohtani, T., S. Nakagawa, M. Kurosawa, M. Mizuashi, M. Ozawa et S. Aiba. 2005. "Cellular basis of the role of diesel exhaust particles in inducing Th2-dominant response". *J Immunol*, 174 (4): 2412-9.
- Omer, F.M., J.B. de Souza et E.M. Riley. 2003. "Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections". *J Immunol*, 171 (10): 5430-6.
- Omer, F.M. et E.M. Riley. 1998. "Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection". *J Exp Med*, 188 (1): 39-48.
- Omodeo-Sale, F., D. Monti, P. Olliaro et D. Taramelli. 2001. "Prooxidant activity of beta-hematin (synthetic malaria pigment) in arachidonic acid micelles and phospholipid large unilamellar vesicles". *Biochem Pharmacol*, 61 (8): 999-1009.
- Omodeo-Sale, F., A. Motti, N. Basilico, S. Parapini, P. Olliaro et D. Taramelli. 2003. "Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*". *Blood*, 102 (2): 705-11.
- Omodeo-Sale, F., A. Motti, A. Dondorp, N.J. White et D. Taramelli. 2005. "Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products". *Eur J Haematol*, 74 (4): 324-32.
- Ong'echa, J.M., A.M. Remo, J. Kristoff, J.B. Hittner, T. Were, C. Ouma, R.O. Otieno, J.M. Vulule, C.C. Keller, G.A. Awandare et D.J. Perkins. 2008. "Increased circulating interleukin

(IL)-23 in children with malarial anemia: in vivo and in vitro relationship with co-regulatory cytokines IL-12 and IL-10". *Clin Immunol*, 126 (2): 211-21.

Orange, J.S., T.P. Salazar-Mather, S.M. Opal, R.L. Spencer, A.H. Miller, B.S. McEwen et C.A. Biron. 1995. "Mechanism of interleukin 12-mediated toxicities during experimental viral infections: role of tumor necrosis factor and glucocorticoids". *J Exp Med*, 181 (3): 901-14.

Orjih, A.U. et C.D. Fitch. 1993. "Hemozoin production by *Plasmodium falciparum*: variation with strain and exposure to chloroquine". *Biochim Biophys Acta*, 1157 (3): 270-4.

Orjih, A.U. et R.S. Nussenzweig. 1979. "*Plasmodium berghei*: suppression of antibody response to sporozoite stage by acute blood stage infection". *Clin Exp Immunol*, 38 (1): 1-8.

Othoro, C., A.A. Lal, B. Nahlen, D. Koech, A.S. Orago et V. Udhayakumar. 1999. "A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya". *J Infect Dis*, 179 (1): 279-82.

Otterbein, L.E., F.H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R.J. Davis, R.A. Flavell et A.M. Choi. 2000. "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway". *Nat Med*, 6 (4): 422-8.

Otterbein, L.E. et A.M. Choi. 2000. "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279 (6): L1029-37.

Ouma, C., G.C. Davenport, T. Were, M.F. Otieno, J.B. Hittner, J.M. Vulule, J. Martinson, J.M. Ong'echa, R.E. Ferrell et D.J. Perkins. 2008. "Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production". *Hum Genet*, 124 (5): 515-24.

Pais, T.F. et S. Chatterjee. 2005. "Brain macrophage activation in murine cerebral malaria precedes accumulation of leukocytes and CD8+ T cell proliferation". *J Neuroimmunol*, 163 (1-2): 73-83.

Pamplona, A., A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, S. Epiphonio, A. Chora, C.D. Rodrigues, I.P. Gregoire, M. Cunha-Rodrigues, S. Portugal, M.P. Soares et M.M. Mota. 2007. "Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria". *Nat Med*, 13 (6): 703-10.

Pamplona, A., T. Hanscheid, S. Epiphonio, M.M. Mota et A.M. Vigario. 2009. "Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease". *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (4): 711-6.

Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed et M.J. Lenardo. 2007. "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells". *Nat Immunol*, 8 (12): 1353-62.

- Park, H.S., H.Y. Jung, E.Y. Park, J. Kim, W.J. Lee et Y.S. Bae. 2004. "Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B". *J Immunol*, 173 (6): 3589-93.
- Park, J.B. 2003. "Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages". *Exp Mol Med*, 35 (5): 325-35.
- Parroche, P., F.N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B.G. Monks, A. Visintin, K.A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D.C. Bartholomeu, R.T. Gazzinelli et D.T. Golenbock. 2007. "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (6): 1919-24.
- Parry, R.V., J.M. Chemnitz, K.A. Frauwirth, A.R. Lanfranco, I. Braunstein, S.V. Kobayashi, P.S. Linsley, C.B. Thompson et J.L. Riley. 2005. "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms". *Mol Cell Biol*, 25 (21): 9543-53.
- Pasare, C. et R. Medzhitov. 2003. "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells". *Science*, 299 (5609): 1033-6.
- Penhale, W.J., A. Farmer, R.P. McKenna et W.J. Irvine. 1973. "Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats". *Clin Exp Immunol*, 15 (2): 225-36.
- Penhale, W.J., W.J. Irvine, J.R. Inglis et A. Farmer. 1976. "Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells". *Clin Exp Immunol*, 25 (1): 6-16.
- Perignon, J.L. et P. Druilhe. 1994. "Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria". *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89 Suppl 2: 51-3.
- Perkins, D.J., J.M. Moore, J. Otieno, Y.P. Shi, B.L. Nahlen, V. Udhayakumar et A.A. Lal. 2003. "In vivo acquisition of hemozoin by placental blood mononuclear cells suppresses PGE2, TNF-alpha, and IL-10". *Biochem Biophys Res Commun*, 311 (4): 839-46.
- Perkins, D.J., J.B. Weinberg et P.G. Kremsner. 2000. "Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity". *J Infect Dis*, 182 (3): 988-92.
- Perkins, S.L., I.N. Sarkar et R. Carter. 2007. "The phylogeny of rodent malaria parasites: simultaneous analysis across three genomes". *Infect Genet Evol*, 7 (1): 74-83.
- Perlmann, P., H. Perlmann, G. ElGhazali et M.T. Blomberg. 1999. "IgE and tumor necrosis factor in malaria infection". *Immunol Lett*, 65 (1-2): 29-33.
- Perlmann, P. et M. Troye-Blomberg. 2000. "Malaria blood-stage infection and its control by the immune system". *Folia Biol (Praha)*, 46 (6): 210-8.

- Perlmann, P. et M. Troye-Blomberg. 2002. "Malaria Immunology". *Chem Immunol.*, 80: 1-26.
- Perry, J.A., C.S. Olver, R.C. Burnett et A.C. Avery. 2005. "Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation". *J Immunol*, 174 (10): 5921-5.
- Peterson, J.D., L.A. Herzenberg, K. Vasquez et C. Waltenbaugh. 1998. "Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (6): 3071-6.
- Petrovas, C., D.A. Price, J. Mattapallil, D.R. Ambrozak, C. Geldmacher, V. Cecchinato, M. Vaccari, E. Tryniszewska, E. Gostick, M. Roederer, D.C. Douek, S.H. Morgan, S.J. Davis, G. Franchini et R.A. Koup. 2007. "SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection". *Blood*, 110 (3): 928-36.
- Phan, G.Q., J.C. Yang, R.M. Sherry, P. Hwu, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, N.P. Restifo, L.R. Haworth, C.A. Seipp, L.J. Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, P.H. Duray, S.M. Steinberg, J.P. Allison, T.A. Davis et S.A. Rosenberg. 2003. "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (14): 8372-7.
- Phillips, R.E., S. Looareesuwan, D.A. Warrell, S.H. Lee, J. Karbwang, M.J. Warrell, N.J. White, C. Swasdichai et D.J. Weatherall. 1986. "The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration". *Q J Med*, 58 (227): 305-23.
- Piccirillo, C.A., J.J. Letterio, A.M. Thornton, R.S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara et E.M. Shevach. 2002. "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness". *J Exp Med*, 196 (2): 237-46.
- Piccirillo, C.A. et E.M. Shevach. 2001. "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells". *J Immunol*, 167 (3): 1137-40.
- Pichyangkul, S., P. Saengkrai et H.K. Webster. 1994. "Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta". *Am J Trop Med Hyg*, 51 (4): 430-5.
- Picot, S., F. Peyron, J.P. Vuillez, G. Barbe, K. Marsh et P. Ambroise-Thomas. 1990. "Tumor necrosis factor production by human macrophages stimulated in vitro by Plasmodium falciparum". *Infect Immun*, 58 (1): 214-6.
- Piguet, P.F., C. Da Laperrousaz, C. Vesin et Y. Donati. 2001. "Incidence of apoptosis in the lymphoid organs of normal or malaria infected mice is decreased in CD18 and urokinase-receptor (UPAR, CD87) deficient mice". *Dev Immunol*, 8 (3-4): 183-91.

- Pillai, V., S.B. Ortega, C.K. Wang et N.J. Karandikar. 2007. "Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells". *Clin Immunol*, 123 (1): 18-29.
- Pimstone, N.R., R. Tenhunen, P.T. Seitz, H.S. Marver et R. Schmid. 1971. "The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages". *J Exp Med*, 133 (6): 1264-81.
- Plebanski, M., K.L. Flanagan, E.A. Lee, W.H. Reece, K. Hart, C. Gelder, G. Gillespie, M. Pinder et A.V. Hill. 1999. "Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell epitope of *Plasmodium falciparum*". *Immunity*, 10 (6): 651-60.
- Pongponratn, E., M. Riganti, D. Bunnag et T. Harinasuta. 1987. "Spleen in falciparum malaria: ultrastructural study". *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 18 (4): 491-501.
- Porto, B.N., L.S. Alves, P.L. Fernandez, T.P. Dutra, R.T. Figueiredo, A.V. Graca-Souza et M.T. Bozza. 2007. "Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors". *J Biol Chem*, 282 (33): 24430-6.
- Postma, N.S., E.C. Mommers, W.M. Eling et J. Zuidema. 1996. "Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy". *Pharm World Sci*, 18 (4): 121-9.
- Powrie, F., S. Read, C. Mottet, H. Uhlig et K. Maloy. 2003. "Control of immune pathology by regulatory T cells". *Novartis Found Symp*, 252: 92-8; discussion 98-105, 106-14.
- Prada, J., J. Malinowski, S. Muller, U. Bienzle et P.G. Kremsner. 1995. "Hemozoin differentially modulates the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor in murine malaria". *Eur Cytokine Netw*, 6 (2): 109-12.
- Prada, J., J. Malinowski, S. Muller, U. Bienzle et P.G. Kremsner. 1996. "Effects of *Plasmodium vinckei* hemozoin on the production of oxygen radicals and nitrogen oxides in murine macrophages". *Am J Trop Med Hyg*, 54 (6): 620-4.
- Pranker, T.A. 1963. "The Red Cell and the Spleen". *Schweiz Med Wochenschr*, 93: 1485-90.
- Pranker, T.A. 1963. "The Spleen and Anaemia". *Br Med J*, 2 (5356): 517-24.
- Prato, M., G. Giribaldi, M. Polimeni, V. Gallo et P. Arese. 2005. "Phagocytosis of hemozoin enhances matrix metalloproteinase-9 activity and TNF-alpha production in human monocytes: role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of falciparum malaria". *J Immunol*, 175 (10): 6436-42.
- Prommano, O., U. Chaisri, G.D. Turner, P. Wilairatana, D.J. Ferguson, P. Viriyavejakul, N.J. White et E. Pongponratn. 2005. "A quantitative ultrastructural study of the liver and the spleen in fatal falciparum malaria". *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 36 (6): 1359-70.

- Prudencio, M., A. Rodriguez et M.M. Mota. 2006. "The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage". *Nat Rev Microbiol*, 4 (11): 849-56.
- Qi, J., J. Zhang, W. Feng, X. Luo, C. Li et Z. Zhang. 2000. "Promoting effect of IFN-gamma on the expression of LPS-induced IL-12 p40 and p35 mRNA in murine suppressor macrophages". *Sci China C Life Sci*, 43 (6): 578-88.
- Raghavan, S. et J. Holmgren. 2005. "CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease". *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44 (2): 121-7.
- Randall, L.M., F.H. Amante, K.A. McSweeney, Y. Zhou, A.C. Stanley, A. Haque, M.K. Jones, G.R. Hill, G.M. Boyle et C.R. Engwerda. 2008. "Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities". *Infect Immun*, 76 (7): 3312-20.
- Read, S., V. Malmstrom et F. Powrie. 2000. "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation". *J Exp Med*, 192 (2): 295-302.
- Remy, S., P. Blancou, L. Tesson, V. Tardif, R. Brion, P.J. Royer, R. Motterlini, R. Foresti, M. Painchaut, S. Pogu, M. Gregoire, J.M. Bach, I. Anegon et C. Chauveau. 2009. "Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity". *J Immunol*, 182 (4): 1877-84.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong et Y. Wang. 2007. "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells". *Cell Death Differ*, 14 (12): 2076-84.
- Riccio, E.K., I.N. Junior, L.R. Riccio, M. das Gracias Alecrim, S. Corte-Real, M. Morgado, C.T. Daniel-Ribeiro et M. de Fatima Ferreira-da-Cruz. 2003. "Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks". *Parasitol Res*, 90 (1): 9-18.
- Riley, E.M., O. Jobe, M. Blackman, H.C. Whittle et B.M. Greenwood. 1989. "Plasmodium falciparum schizont sonic extracts suppress lymphoproliferative responses to mitogens and antigens in malaria-immune adults". *Infect Immun*, 57 (10): 3181-8.
- Riley, E.M., O. Jobe et H.C. Whittle. 1989. "CD8+ T cells inhibit Plasmodium falciparum-induced lymphoproliferation and gamma interferon production in cell preparations from some malaria-immune individuals". *Infect Immun*, 57 (4): 1281-4.
- Riley, E.M., C. MacLennan, D.K. Wiatkowski et B.M. Greenwood. 1989. "Suppression of in-vitro lymphoproliferative responses in acute malaria patients can be partially reversed by indomethacin". *Parasite Immunol*, 11 (5): 509-17.
- Riley, E.M., S. Wahl, D.J. Perkins et L. Schofield. 2006. "Regulating immunity to malaria". *Parasite Immunol*, 28 (1-2): 35-49.



- Rockett, K.A., M.M. Awburn, E.J. Rockett, W.B. Cowden et I.A. Clark. 1994. "Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression". *Parasite Immunol*, 16 (5): 243-9.
- Romagnani, S. 1996. "Th1 and Th2 in human diseases". *Clin Immunol Immunopathol*, 80 (3 Pt 1): 225-35.
- Romagnani, S. 1999. "Th1/Th2 cells". *Inflamm Bowel Dis*, 5 (4): 285-94.
- Romagnani, S. 2000. "T-cell subsets (Th1 versus Th2)". *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85 (1): 9-18; quiz 18, 21.
- Ronai, Z., H. Avraham et D. Sulitzeanu. 1981. "Autoantibodies to red blood cells in rats infected with *Plasmodium berghei*". *J Parasitol*, 67 (3): 351-4.
- Roncarolo, M.G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula et M.K. Levings. 2001. "Type 1 T regulatory cells". *Immunol Rev*, 182: 68-79.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori et M. Levings. 2003. "Type 1 T regulatory cells and their relationship with CD4+CD25+ T regulatory cells". *Novartis Found Symp*, 252: 115-27; discussion 127-31, 203-10.
- Rous, P. 1923. "Destruction of the red blood corpuscles in health and disease". *Physiol. Rev.*, 3 (1): 75-105.
- Rushworth, S.A. et M.A. O'Connell. 2004. "Haem oxygenase-1 in inflammation". *Biochem Soc Trans*, 32 (Pt 6): 1093-4.
- Saba, T.M. 1970. "Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system". *Arch Intern Med*, 126 (6): 1031-52.
- Sacks, B. 1925. "The reticulo-endothelial system". *New York City*: 504-545.
- Saito, S., M. Matsuura et Y. Hirai. 2006. "Regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production by activation of repressor element GA-12 through hyperactivation of the ERK pathway". *Clin Vaccine Immunol*, 13 (8): 876-83.
- Sakaguchi, S. 2003. "Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors". *J Exp Med*, 197 (4): 397-401.
- Sakaguchi, S. 2003. "The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery". *J Clin Invest*, 112 (9): 1310-2.
- Sakaguchi, S. 2004. "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses". *Annu Rev Immunol*, 22: 531-62.
- Sakaguchi, S. 2005. "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self". *Nat Immunol*, 6 (4): 345-52.



- Sakaguchi, S., T. Takahashi et Y. Nishizuka. 1982. "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis". *J Exp Med*, 156 (6): 1577-86.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura et M. Ono. 2008. "Regulatory T cells and immune tolerance". *Cell*, 133 (5): 775-87.
- Sakahira, H., M. Enari et S. Nagata. 1998. "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis". *Nature*, 391 (6662): 96-9.
- Salganik, R.I. 2001. "The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population". *J Am Coll Nutr*, 20 (5 Suppl): 464S-472S; discussion 473S-475S.
- Salkowski, C.A., K. Kopydlowski, J. Blanco, M.J. Cody, R. McNally et S.N. Vogel. 1999. "IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice". *J Immunol*, 163 (3): 1529-36.
- Salmon, R.A., X. Guo, H.S. Teh et J.W. Schrader. 2001. "The p38 mitogen-activated protein kinases can have opposing roles in the antigen-dependent or endotoxin-stimulated production of IL-12 and IFN-gamma". *Eur J Immunol*, 31 (11): 3218-27.
- Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe et J.A. Bluestone. 2000. "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes". *Immunity*, 12 (4): 431-40.
- Sam, H. et M.M. Stevenson. 1999. "In vivo IL-12 production and IL-12 receptors beta1 and beta2 mRNA expression in the spleen are differentially up-regulated in resistant B6 and susceptible A/J mice during early blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria". *J Immunol*, 162 (3): 1582-9.
- Sambrano, G.R., S. Parthasarathy et D. Steinberg. 1994. "Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (8): 3265-9.
- Sanjabi, S., A. Hoffmann, H.C. Liou, D. Baltimore et S.T. Smale. 2000. "Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (23): 12705-10.
- Saraiva, M. et A. O'Garra. 2010. "The regulation of IL-10 production by immune cells". *Nat Rev Immunol*, 10 (3): 170-81.
- Sato, S., O. Takeuchi, T. Fujita, H. Tomizawa, K. Takeda et S. Akira. 2002. "A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways". *Int Immunol*, 14 (7): 783-91.

- Saxena, R.K. et S. Khandelwal. 2009. "Aging and destruction of blood erythrocytes in mice". *Current Science*, 97 (4): 500-507.
- Scheel-Toellner, D., K. Wang, R. Craddock, P.R. Webb, H.M. McGettrick, L.K. Assi, N. Parkes, L.E. Clough, E. Gulbins, M. Salmon et J.M. Lord. 2004. "Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling". *Blood*, 104 (8): 2557-64.
- Schenk, H., M. Vogt, W. Droge et K. Schulze-Osthoff. 1996. "Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression". *J Immunol*, 156 (2): 765-71.
- Schluns, K.S. et L. Lefrancois. 2003. "Cytokine control of memory T-cell development and survival". *Nat Rev Immunol*, 3 (4): 269-79.
- Schmitt, T.H., W.A. Frezzatti, Jr. et S. Schreier. 1993. "Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis". *Arch Biochem Biophys*, 307 (1): 96-103.
- Schofield, L., A. Ferreira, R. Altszuler, V. Nussenzweig et R.S. Nussenzweig. 1987. "Interferon-gamma inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites in vitro". *J Immunol*, 139 (6): 2020-5.
- Schofield, L. et G.E. Grau. 2005. "Immunological processes in malaria pathogenesis". *Nat Rev Immunol*, 5 (9): 722-35.
- Schofield, L. et F. Hackett. 1993. "Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites". *J Exp Med*, 177 (1): 145-53.
- Schofield, L., J. Villaquiran, A. Ferreira, H. Schellekens, R. Nussenzweig et V. Nussenzweig. 1987. "Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites". *Nature*, 330 (6149): 664-6.
- Schreck, R., P. Rieber et P.A. Baeuerle. 1991. "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1". *Embo J*, 10 (8): 2247-58.
- Schroit, A.J., Y. Tanaka, J. Madsen et I.J. Fidler. 1984. "The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry". *Biol Cell*, 51 (2): 227-38.
- Schubert, L.A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell et S.F. Ziegler. 2001. "Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation". *J Biol Chem*, 276 (40): 37672-9.
- Schwartz, R.H. 2005. "Natural regulatory T cells and self-tolerance". *Nat Immunol*, 6 (4): 327-30.

Schwarzer, E., M. Alessio, D. Ulliers et P. Arese. 1998. "Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes". *Infect Immun*, 66 (4): 1601-6.

Schwarzer, E. et P. Arese. 1996. "Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages". *Biochim Biophys Acta*, 1316 (3): 169-75.

Schwarzer, E., F. De Matteis, G. Giribaldi, D. Ulliers, E. Valente et P. Arese. 1999. "Hemozoin stability and dormant induction of heme oxygenase in hemozoin-fed human monocytes". *Mol Biochem Parasitol*, 100 (1): 61-72.

Schwarzer, E., P. Ludwig, E. Valente et P. Arese. 1999. "15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes". *Parassitologia*, 41 (1-3): 199-202.

Schwarzer, E., O. Muller, P. Arese, W.G. Siems et T. Grune. 1996. "Increased levels of 4-hydroxynonenal in human monocytes fed with malarial pigment hemozoin. A possible clue for hemozoin toxicity". *FEBS Lett*, 388 (2-3): 119-22.

Schwarzer, E., F. Turrini et P. Arese. 1994. "A luminescence method for the quantitative determination of phagocytosis of erythrocytes, of malaria-parasitized erythrocytes and of malarial pigment". *Br J Haematol*, 88 (4): 740-5.

Schwarzer, E., F. Turrini, D. Ulliers, G. Giribaldi, H. Ginsburg et P. Arese. 1992. "Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment". *J Exp Med*, 176 (4): 1033-41.

Scorza, T., K. Grubb, P. Smooker, A. Rainczuk, D. Proll et T.W. Spithill. 2005. "Induction of strain-transcending immunity against *Plasmodium chabaudi* adami malaria with a multiepitope DNA vaccine". *Infect Immun*, 73 (5): 2974-85.

Scorza, T., S. Magez, L. Brys et P. De Baetselier. 1999. "Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression". *Parasite Immunol*, 21 (11): 545-54.

Scott, J.G. 1944. "Herpes simplex cornea in malaria". *British Medical*

*Journal*, 2: 213-215.

Sedegah, M., F. Finkelman et S.L. Hoffman. 1994. "Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (22): 10700-2.

Seixas, E., R. Gozzelino, A. Chora, A. Ferreira, G. Silva, R. Larsen, S. Rebelo, C. Penido, N.R. Smith, A. Coutinho et M.P. Soares. 2009. "Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (37): 15837-42.

Shalev, O., T. Repka, A. Goldfarb, L. Grinberg, A. Abrahamov, N.F. Olivieri, E.A. Rachmilewitz et R.P. Heibel. 1995. "Deferiprone (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo". *Blood*, 86 (5): 2008-13.

Shear, H.L. 1988. "Variation in expression of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in rodents with malaria". *Infect Immun*, 56 (11): 3007-10.

Sherry, B.A., G. Alava, K.J. Tracey, J. Martiney, A. Cerami et A.F. Slater. 1995. "Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo". *J Inflamm*, 45 (2): 85-96.

Shevach, E.M. 2006. "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells". *Immunity*, 25 (2): 195-201.

Shevach, E.M., R.A. DiPaolo, J. Andersson, D.M. Zhao, G.L. Stephens et A.M. Thornton. 2006. "The lifestyle of naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells". *Immunol Rev*, 212: 60-73.

Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida et S. Sakaguchi. 2002. "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance". *Nat Immunol*, 3 (2): 135-42.

Shio, M.T., S.C. Eisenbarth, M. Savaria, A.F. Vinet, M.J. Bellemare, K.W. Harder, F.S. Sutterwala, D.S. Bohle, A. Descoteaux, R.A. Flavell et M. Olivier. 2009. "Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases". *PLoS Pathog*, 5 (8): e1000559.

Shio, M.T., F.A. Kassa, M.J. Bellemare et M. Olivier. 2010. "Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin". *Microbes Infect*.

Sihorkar, V. et S.P. Vyas. 2001. "Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization". *J Pharm Pharm Sci*, 4 (2): 138-58.

Silver, B.J., B.D. Hamilton et Z. Toossi. 1997. "Suppression of TNF-alpha gene expression by hemin: implications for the role of iron homeostasis in host inflammatory responses". *J Leukoc Biol*, 62 (4): 547-52.

Simon, H.U. 2003. "Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation". *Immunol Rev*, 193: 101-10.

Simon, H.U., A. Haj-Yehia et F. Levi-Schaffer. 2000. "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction". *Apoptosis*, 5 (5): 415-8.

Simunek, T., M. Sterba, O. Popelova, H. Kaiserova, M. Adamcova, M. Hroch, P. Haskova, P. Ponka et V. Gersl. 2008. "Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is

differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone". *Br J Pharmacol*, 155 (1): 138-48.

Singer, D.B. 1973. "Postsplenectomy sepsis". *Perspect Pediatr Pathol*, 1: 285-311.

Skorokhod, O.A., M. Alessio, B. Mordmuller, P. Arese et E. Schwarzer. 2004. "Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect". *J Immunol*, 173 (6): 4066-74.

Slater, A.F., W.J. Swiggard, B.R. Orton, W.D. Flitter, D.E. Goldberg, A. Cerami et G.B. Henderson. 1991. "An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (2): 325-9.

Smith, H.J. et M. Meremikwu. 2000. "Iron chelating agents for treating malaria". *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD001474.

Smith, H.J. et M. Meremikwu. 2003. "Iron chelating agents for treating malaria". *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD001474.

Snijders, A., C.M. Hilkens, T.C. van der Pouw Kraan, M. Engel, L.A. Aarden et M.L. Kapsenberg. 1996. "Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit". *J Immunol*, 156 (3): 1207-12.

Sobolewski, P., I. Gramaglia, J.A. Frangos, M. Intaglietta et H. van der Heyde. 2005. "Plasmodium berghei resists killing by reactive oxygen species". *Infect Immun*, 73 (10): 6704-10.

Soe-Lin, S., S.S. Apte, B. Andriopoulos, Jr., M.C. Andrews, M. Schranzhofer, T. Kahawita, D. Garcia-Santos et P. Ponka. 2009. "Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (14): 5960-5.

Soe, S., A. Khin Saw, A. Htay, W. Nay, A. Tin, S. Than, C. Roussilhon, J.L. Perignon et P. Druilhe. 2001. "Premunition against Plasmodium falciparum in a malaria hyperendemic village in Myanmar". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95 (1): 81-4.

Sprent, J. et C.D. Surh. 2002. "T cell memory". *Annu Rev Immunol*, 20: 551-79.

Steck, T.L. et J.A. Kant. 1974. "Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes". *Methods Enzymol*, 31 (Pt A): 172-80.

Steeg, C., G. Adler, T. Sparwasser, B. Fleischer et T. Jacobs. 2009. "Limited role of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria". *J Immunol*, 183 (11): 7014-22.

- Steinbuchel, A. et R. Marchessault. 2005. "Biopolymers for Medicinal and Pharmaceutical Applications - Hemozoin: a Biocrytal Synthesized during the Degradation of Hemoglobin ". *Wiley-VCH, Weinheim, Germany*, 1 (Chapter 7 by Sullivan, D.J.): 129-137.
- Stern, A.S., F.J. Podlaski, J.D. Hulmes, Y.C. Pan, P.M. Quinn, A.G. Wolitzky, P.C. Familletti, D.L. Stremlo, T. Truitt, R. Chizzonite et al. 1990. "Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (17): 6808-12.
- Stevenson, M.M. et E.M. Riley. 2004. "Innate immunity to malaria". *Nat Rev Immunol*, 4 (3): 169-80.
- Stevenson, M.M. et M.F. Tam. 1993. "Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice". *Clin Exp Immunol*, 92 (1): 77-83.
- Stevenson, M.M., M.F. Tam, S.F. Wolf et A. Sher. 1995. "IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism". *J Immunol*, 155 (5): 2545-56.
- Stewart, M.J., R.J. Nawrot, S. Schulman et J.P. Vanderberg. 1986. "*Plasmodium berghei* sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies". *Infect Immun*, 51 (3): 859-64.
- Stiebler, R., J.B. Soares, B.L. Timm, J.R. Silva, F.B. Mury, M. Dansa-Petretski et M.F. Oliveira. 2011. "On the mechanisms involved in biological heme crystallization". *J Bioenerg Biomembr*, 43 (1): 93-9.
- Strauch, U.G., F. Obermeier, N. Grunwald, S. Gurster, N. Dunger, M. Schultz, D.P. Griese, M. Mahler, J. Scholmerich et H.C. Rath. 2005. "Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis". *Gut*, 54 (11): 1546-52.
- Struik, S.S. et E.M. Riley. 2004. "Does malaria suffer from lack of memory?" *Immunol Rev*, 201: 268-90.
- Su, Z. et M.M. Stevenson. 2000. "Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection". *Infect Immun*, 68 (8): 4399-406.
- Suarez-Mutis, M.C., P. Cuervo, F.M. Leoratti, S.L. Moraes-Avila, A.W. Ferreira, O. Fernandes et J.R. Coura. 2007. "Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 49 (3): 159-64.
- Sullivan, A.D., I. Ittarat et S.R. Meshnick. 1996. "Patterns of haemozoin accumulation in tissue". *Parasitology*, 112 ( Pt 3): 285-94.

Sun, C.M., J.A. Hall, R.B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J.R. Mora et Y. Belkaid. 2007. "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid". *J Exp Med*, 204 (8): 1775-85.

Sutmuller, R.P., M.H. den Brok, M. Kramer, E.J. Bennink, L.W. Toonen, B.J. Kullberg, L.A. Joosten, S. Akira, M.G. Netea et G.J. Adema. 2006. "Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells". *J Clin Invest*, 116 (2): 485-494.

Sutmuller, R.P., L.M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T.N. Schumacher, M.E. Wildenberg, J.P. Allison, R.E. Toes, R. Offringa et C.J. Melief. 2001. "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses". *J Exp Med*, 194 (6): 823-32.

Suvas, S. et B.T. Rouse. 2006. "Treg control of antimicrobial T cell responses". *Curr Opin Immunol*, 18 (3): 344-8.

Taams, L.S. et A.N. Akbar. 2005. "Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells". *Curr Top Microbiol Immunol*, 293: 115-31.

Tachado, S.D., P. Gerold, R. Schwarz, S. Novakovic, M. McConville et L. Schofield. 1997. "Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8): 4022-7.

Tadokoro, C.E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A.C. Lino, A. Maraver, J.J. Lafaille et M.L. Dustin. 2006. "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo". *J Exp Med*, 203 (3): 505-11.

Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu et S. Sakaguchi. 1998. "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state". *Int Immunol*, 10 (12): 1969-80.

Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak et S. Sakaguchi. 2000. "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4". *J Exp Med*, 192 (2): 303-10.

Tanaka, K., Y. Usui et S. Kojo. 2001. "Role of serum components in the binding and phagocytosis of oxidatively damaged erythrocytes by autologous mouse macrophages". *Cell Mol Life Sci*, 58 (11): 1727-33.

Tanaka, M. 2005. "Apoptotic cell clearance by phagocytes". *International Congress Series*, 1285: 55-59.

- Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel et J.A. Bluestone. 2006. "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice". *Nat Immunol*, 7 (1): 83-92.
- Taramelli, D., N. Basilico, E. Pagani, R. Grande, D. Monti, M. Ghione et P. Olliaro. 1995. "The heme moiety of malaria pigment (beta-hematin) mediates the inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages". *Exp Parasitol*, 81 (4): 501-11.
- Taramelli, D., S. Recalcati, N. Basilico, P. Olliaro et G. Cairo. 2000. "Macrophage preconditioning with synthetic malaria pigment reduces cytokine production via heme iron-dependent oxidative stress". *Lab Invest*, 80 (12): 1781-8.
- Taylor-Robinson, A.W. 1995. "Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models". *Parasitol Today*, 11 (9): 334-42.
- Taylor-Robinson, A.W. 2010. "Regulation of immunity to Plasmodium: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design". *Exp Parasitol*, 126 (3): 406-14.
- Taylor-Robinson, A.W. et R.S. Phillips. 1994. "B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to Plasmodium chabaudi chabaudi infection". *Infect Immun*, 62 (6): 2490-8.
- Taylor-Robinson, A.W., R.S. Phillips, A. Severn, S. Moncada et F.Y. Liew. 1993. "The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection". *Science*, 260 (5116): 1931-4.
- Tekwani, B.L. et L.A. Walker. 2005. "Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro beta-hematin formation assay". *Comb Chem High Throughput Screen*, 8 (1): 63-79.
- Tenhunen, R., H.S. Marver et R. Schmid. 1968. "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61 (2): 748-55.
- Thierfelder, W.E., J.M. van Deursen, K. Yamamoto, R.A. Tripp, S.R. Sarawar, R.T. Carson, M.Y. Sangster, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G.C. Grosveld et J.N. Ihle. 1996. "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells". *Nature*, 382 (6587): 171-4.
- Thornton, A.M. et E.M. Shevach. 1998. "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production". *J Exp Med*, 188 (2): 287-96.
- Thuma, P.E., G.F. Mabeza, G. Biemba, G.J. Bhat, C.E. McLaren, V.M. Moyo, S. Zulu, H. Khumalo, P. Mabeza, A. M'Hango, D. Parry, A.A. Poltera, G.M. Brittenham et V.R. Gordeuk. 1998. "Effect of iron chelation therapy on mortality in Zambian children with cerebral malaria". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92 (2): 214-8.



- Thumwood, C.M., N.H. Hunt, W.B. Cowden et I.A. Clark. 1989. "Antioxidants can prevent cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice". *Br J Exp Pathol*, 70 (3): 293-303.
- Tilg, H., H. Ulmer, A. Kaser et G. Weiss. 2002. "Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation". *J Immunol*, 169 (4): 2204-9.
- Todryk, S.M., P. Bejon, T. Mwangi, M. Plebanski, B. Urban, K. Marsh, A.V. Hill et K.L. Flanagan. 2008. "Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans". *PLoS One*, 3 (4): e2027.
- Toure-Balde, A., J.L. Sarthou, G. Aribot, P. Michel, J.F. Trape, C. Rogier et C. Roussilhon. 1996. "*Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells". *Infect Immun*, 64 (3): 744-50.
- Trachootham, D., J. Alexandre et P. Huang. 2009. "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" *Nat Rev Drug Discov*, 8 (7): 579-91.
- Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E.A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R.S. Balderas, J.P. Routy, E.K. Haddad et R.P. Sekaly. 2006. "Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction". *Nat Med*, 12 (10): 1198-202.
- Treeprasertsuk, S., S. Krudsood, T. Tosukhowong, A.N.W. Maek, S. Vannaphan, T. Saengnetswang, S. Looareesuwan, W.F. Kuhn, G. Brittenham et J. Carroll. 2003. "N-acetylcysteine in severe *falciparum* malaria in Thailand". *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34 (1): 37-42.
- Triantafilou, M., K. Miyake, D.T. Golenbock et K. Triantafilou. 2002. "Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation". *J Cell Sci*, 115 (Pt 12): 2603-11.
- Trinchieri, G. 1998. "Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity". *Adv Immunol*, 70: 83-243.
- Trinchieri, G. 2003. "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity". *Nat Rev Immunol*, 3 (2): 133-46.
- Trinchieri, G., M. Rengaraju, A. D'Andrea, N.M. Valiante, M. Kubin, M. Aste et J. Chehimi. 1993. "Producer cells of interleukin-12". *Immunol Today*, 14 (5): 237-8.
- Trinchieri, G. et P. Scott. 1994. "The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy". *Immunol Today*, 15 (10): 460-3.
- Troye-Blomberg, M., K. Berzins et P. Perlmann. 1994. "T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite". *Crit Rev Immunol*, 14 (2): 131-55.

- Turrini, F., H. Ginsburg, F. Bussolino, G.P. Pescarmona, M.V. Serra et P. Arese. 1992. "Phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage". *Blood*, 80 (3): 801-8.
- Turrini, F., E. Schwarzer et P. Arese. 1993. "The involvement of hemozoin toxicity in depression of cellular immunity". *Parasitol Today*, 9 (8): 297-300.
- Udomsangpetch, R., K. Lundgren, K. Berzins, B. Wahlin, H. Perlmann, M. Troye-Blomberg, J. Carlsson, M. Wahlgren, P. Perlmann et A. Bjorkman. 1986. "Human monoclonal antibodies to Pf 155, a major antigen of malaria parasite Plasmodium falciparum". *Science*, 231 (4733): 57-9.
- Uko, E.K., A.E. Udoh et M.H. Etukudoh. 2003. "Methaemoglobin profile in malaria infected children in Calabar". *Niger J Med*, 12 (2): 94-7.
- Urban, B.C., D.J. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J.M. Austyn et D.J. Roberts. 1999. "Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells". *Nature*, 400 (6739): 73-7.
- Urban, B.C., R. Ing et M.M. Stevenson. 2005. "Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system". *Curr Top Microbiol Immunol*, 297: 25-70.
- Urban, B.C. et D.J. Roberts. 2003. "Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology". *J Exp Med*, 197 (2): 137-41.
- Utsugi, M., K. Dobashi, T. Ishizuka, K. Endou, J. Hamuro, Y. Murata, T. Nakazawa et M. Mori. 2003. "c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production". *J Immunol*, 171 (2): 628-35.
- Utsugi, M., K. Dobashi, Y. Koga, Y. Shimizu, T. Ishizuka, K. Iizuka, J. Hamuro, T. Nakazawa et M. Mori. 2002. "Glutathione redox regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production through p38 mitogen-activated protein kinase activation in human monocytes: role of glutathione redox in IFN-gamma priming of IL-12 production". *J Leukoc Biol*, 71 (2): 339-47.
- Vaidya, B. et S. Pearce. 2004. "The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies". *Eur J Endocrinol*, 150 (5): 619-26.
- van der Heyde, H.C., D. Huszar, C. Woodhouse, D.D. Manning et W.P. Weidanz. 1994. "The resolution of acute malaria in a definitive model of B cell deficiency, the JHD mouse". *J Immunol*, 152 (9): 4557-62.
- Varma, T.K., T.E. Toliver-Kinsky, C.Y. Lin, A.P. Koutrouvelis, J.E. Nichols et E.R. Sherwood. 2001. "Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice". *Infect Immun*, 69 (9): 5249-63.

- Vassalli, P. 1992. "The pathophysiology of tumor necrosis factors". *Annu Rev Immunol*, 10: 411-52.
- Vigario, A.M., O. Gorgette, H.C. Dujardin, T. Cruz, P.A. Cazenave, A. Six, A. Bandeira et S. Pied. 2007. "Regulatory CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria". *Int J Parasitol*, 37 (8-9): 963-73.
- Vignais, P.V. 2002. "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism". *Cell Mol Life Sci*, 59 (9): 1428-59.
- Vignali, D.A., L.W. Collison et C.J. Workman. 2008. "How regulatory T cells work". *Nat Rev Immunol*, 8 (7): 523-32.
- von der Weid, T., N. Honarvar et J. Langhorne. 1996. "Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection". *J Immunol*, 156 (7): 2510-6.
- Wagener, F.A., A. Eggert, O.C. Boerman, W.J. Oyen, A. Verhofstad, N.G. Abraham, G. Adema, Y. van Kooyk, T. de Witte et C.G. Figdor. 2001. "Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase". *Blood*, 98 (6): 1802-11.
- Wagener, F.A., H.D. Volk, D. Willis, N.G. Abraham, M.P. Soares, G.J. Adema et C.G. Figdor. 2003. "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation". *Pharmacol Rev*, 55 (3): 551-71.
- Wahlin, B., M. Wahlgren, H. Perlmann, K. Berzins, A. Bjorkman, M.E. Patarroyo et P. Perlmann. 1984. "Human antibodies to a Mr 155,000 Plasmodium falciparum antigen efficiently inhibit merozoite invasion". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (24): 7912-6.
- Waitumbi, J.N., M.O. Opollo, R.O. Muga, A.O. Misore et J.A. Stoute. 2000. "Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia". *Blood*, 95 (4): 1481-6.
- Waldmann, T.A. 2006. "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design". *Nat Rev Immunol*, 6 (8): 595-601.
- Walgate, R. 2001. "Quest for malaria vaccine revs up, but much work remains". *Bull World Health Organ*, 79 (10): 1002-4.
- Walker, L.S., A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms et A.K. Abbas. 2003. "Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo". *J Exp Med*, 198 (2): 249-58.
- Walther, M., J.E. Tongren, L. Andrews, D. Korbel, E. King, H. Fletcher, R.F. Andersen, P. Bejon, F. Thompson, S.J. Dunachie, F. Edele, J.B. de Souza, R.E. Sinden, S.C. Gilbert, E.M. Riley et A.V. Hill. 2005. "Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection". *Immunity*, 23 (3): 287-96.

- Wanachiwanawin, W., E. Wiener, U. Siripanyaphinyo, S. Chinprasertsuk, F. Mawas, S. Fucharoen, S.N. Wickramasinghe, P. Pootrakul et S. Visudhiphan. 1999. "Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interferon-gamma in beta(o)-thalassemia/HbE and their clinical significance". *J Interferon Cytokine Res*, 19 (2): 105-11.
- Wang, C.Q., K.B. Udupa et D.A. Lipschitz. 1996. "Evidence suggesting a stimulatory role for interleukin-10 in erythropoiesis in vitro". *J Cell Physiol*, 166 (2): 305-10.
- Warren, H.S. et W.P. Weidanz. 1976. "Malarial immunodepression in vitro: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes". *Eur J Immunol*, 6 (11): 816-9.
- Watt, G., K. Jongsakul et R. Ruangvirayuth. 2002. "A pilot study of N-acetylcysteine as adjunctive therapy for severe malaria". *Qjm*, 95 (5): 285-90.
- Weiner, H.L. 2001. "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells". *Immunol Rev*, 182: 207-14.
- Weiss, G. et L.T. Goodnough. 2005. "Anemia of chronic disease". *N Engl J Med*, 352 (10): 1011-23.
- Weiss, W.R., S. Mellouk, R.A. Houghten, M. Sedegah, S. Kumar, M.F. Good, J.A. Berzofsky, L.H. Miller et S.L. Hoffman. 1990. "Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes". *J Exp Med*, 171 (3): 763-73.
- West, M.A. et W. Heagy. 2002. "Endotoxin tolerance: a review". *Crit Care Med*, 30 (1 Suppl): S64-73.
- Whittle, H.C., J. Brown, K. Marsh, B.M. Greenwood, P. Seidelin, H. Tighe et L. Wedderburn. 1984. "T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during *P. falciparum* malaria". *Nature*, 312 (5993): 449-50.
- Wichmann, D., R.T. Schwarz, V. Ruppert, S. Ehrhardt, J.P. Cramer, G.D. Burchard, B. Maisch et F. Debierre-Grockiego. 2007. "Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol induces limited apoptosis in liver and spleen mouse tissue". *Apoptosis*, 12 (6): 1037-41.
- Wickramasinghe, S.N. et S.H. Abdalla. 2000. "Blood and bone marrow changes in malaria". *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13 (2): 277-99.
- Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby et M.E. Brunkow. 2001. "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy". *Nat Genet*, 27 (1): 18-20.

- Williamson, W.A. et B.M. Greenwood. 1978. "Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria". *Lancet*, 1 (8078): 1328-9.
- Wipasa, J., S. Elliott, H. Xu et M.F. Good. 2002. "Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches". *Immunol Cell Biol*, 80 (5): 401-14.
- Wong, K.A. et A. Rodriguez. 2008. "Plasmodium infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells". *J Immunol*, 180 (2): 716-26.
- Woodruff, A.W., V.E. Ansdel et L.E. Pettitt. 1979. "Cause of anaemia in malaria". *Lancet*, 1 (8125): 1055-7.
- Wooles, W.R. et N.R. Diluzio. 1963. "Reticuloendothelial Function and the Immune Response". *Science*, 142: 1078-80.
- World Health Organization. 2009. "Guideline for the treatment of malaria, Second Edition". *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*: 1-210.
- World Health Organization. 2010. "World Malaria Report 2009". *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*: 1-78.
- Wu, C.C., K.C. Lu, J.S. Chen, H.Y. Hsieh, S.H. Lin, P. Chu, J.Y. Wang, H.K. Sytwu et Y.F. Lin. 2008. "HO-1 induction ameliorates experimental murine membranous nephropathy: anti-oxidative, anti-apoptotic and immunomodulatory effects". *Nephrol Dial Transplant*, 23 (10): 3082-90.
- Wunderlich, F., M. Helwig, G. Schillinger, H. Vial, J. Philippot et V. Speth. 1987. "Isolation and characterization of parasites and host cell ghosts from erythrocytes infected with *Plasmodium chabaudi*". *Mol Biochem Parasitol*, 23 (2): 103-15.
- Wykes, M., C. Keighley, A. Pinzon-Charry et M.F. Good. 2007. "Dendritic cell biology during malaria". *Cell Microbiol*, 9 (2): 300-5.
- Wykes, M.N. et M.F. Good. 2008. "What really happens to dendritic cells during malaria?" *Nat Rev Microbiol*, 6 (11): 864-70.
- Wysocka, M., M. Kubin, L.Q. Vieira, L. Ozmen, G. Garotta, P. Scott et G. Trinchieri. 1995. "Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice". *Eur J Immunol*, 25 (3): 672-6.
- Wysocka, M., S. Robertson, H. Riemann, J. Caamano, C. Hunter, A. Mackiewicz, L.J. Montaner, G. Trinchieri et C.L. Karp. 2001. "IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness". *J Immunol*, 166 (12): 7504-13.

- Xia, C.Q. et K.J. Kao. 2003. "Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase". *Scand J Immunol*, 58 (1): 23-32.
- Xu, X., K. Sumita, C. Feng, X. Xiong, H. Shen, S. Maruyama, M. Kanoh et Y. Asano. 2001. "Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice". *J Immunol*, 167 (1): 235-41.
- Yagi, H., T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii et S. Sakaguchi. 2004. "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells". *Int Immunol*, 16 (11): 1643-56.
- Yamamoto, K. et R.B. Johnston, Jr. 1984. "Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages". *J Exp Med*, 159 (2): 405-16.
- Yanez, D.M., D.D. Manning, A.J. Cooley, W.P. Weidanz et H.C. van der Heyde. 1996. "Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria". *J Immunol*, 157 (4): 1620-4.
- Yap, G.S. et M.M. Stevenson. 1994. "Blood transfusion alters the course and outcome of *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice". *Infect Immun*, 62 (9): 3761-5.
- Yap, G.S. et M.M. Stevenson. 1994. "Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in *Plasmodium chabaudi* AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon". *Infect Immun*, 62 (2): 357-62.
- Yi, J.S., M.A. Cox et A.J. Zajac. 2010. "T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion". *Immunology*, 129 (4): 474-81.
- Yin, X.J., J.Y. Ma, J.M. Antonini, V. Castranova et J.K. Ma. 2004. "Roles of reactive oxygen species and heme oxygenase-1 in modulation of alveolar macrophage-mediated pulmonary immune responses to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles". *Toxicol Sci*, 82 (1): 143-53.
- Yoneto, T., T. Yoshimoto, C.R. Wang, Y. Takahama, M. Tsuji, S. Waki et H. Nariuchi. 1999. "Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage *Plasmodium berghei* XAT but neither NO production nor NK cell activation is critical". *Infect Immun*, 67 (5): 2349-56.
- Yoshimoto, T., K. Kojima, T. Funakoshi, Y. Endo, T. Fujita et H. Nariuchi. 1996. "Molecular cloning and characterization of murine IL-12 genes". *J Immunol*, 156 (3): 1082-8.
- Yoshimoto, T., Y. Takahama, C.R. Wang, T. Yoneto, S. Waki et H. Nariuchi. 1998. "A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection". *J Immunol*, 160 (11): 5500-5.



- Yoshimoto, T., T. Yoneto, S. Waki et H. Nariuchi. 1998. "Interleukin-12-dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria parasite *Plasmodium berghei* XAT, an attenuated variant of *P. berghei* NK65". *J Infect Dis*, 177 (6): 1674-81.
- Zambrano-Villa, S., D. Rosales-Borjas, J.C. Carrero et L. Ortiz-Ortiz. 2002. "How protozoan parasites evade the immune response". *Trends Parasitol*, 18 (6): 272-8.
- Zhao, D.M., A.M. Thornton, R.J. DiPaolo et E.M. Shevach. 2006. "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes". *Blood*, 107 (10): 3925-32.
- Zhao, J., H.J. Kong, H. Li, B. Huang, M. Yang, C. Zhu, M. Bogunovic, F. Zheng, L. Mayer, K. Ozato, J. Unkeless et H. Xiong. 2006. "IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways". *J Biol Chem*, 281 (15): 10073-80.
- Zhen-Wei, X., S. Jian-Le, Q. Qi, Z. Wen-Wei, Z. Xue-Hong et Z. Zi-Li. 2007. "Heme oxygenase-1 improves the survival of discordant cardiac xenograft through its anti-inflammatory and anti-apoptotic effects". *Pediatr Transplant*, 11 (8): 850-9.